



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 298 948 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 15/19

C 12 P 21/08

G J1 N 33/68

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 N / 342 467 5

(22) 03.07.90

(44) 19.03.92

(31) 8915414.0

(32) 05.07.89

(33) GB

(71) siehe (73)

(72) Odink, Karol G., Dr., NL; Tarcsay, Lajos, Dr., DE; Brügggen, Josef, Dr., DE; Wiesendanger, Walter, CH; Cor-
letti, Nico, Dr., CH; Sorg, Clemens, Prof. Dr., DE; DeWolf-Poeters, Christiane, Prof. Dr., BE; Delabie, Jan, Dr.,
BE

(73) CIBA-GEIGY AG, 4002 Basel, CH

(74) Hübner, Neumann, Radwor, Rechtsanwalt und Patentanwälte, Frankfurter Allee 286, O - 1130 Berlin, DE

(54) Neue Cytokine

(55) Polypeptide; Entzündungsvermittler; Polypeptid-Mutanten; Polypeptid-Fragmente, DNA
(Desoxyribonukleinsäure); Hybridvektoren; Wirtszellen; polyklonale Antikörper; monoklonale Antikörper; Entzündung;
Hodgkin Lymphoma

(57) Die Erfindung betrifft Polypeptide mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ungefähr 160 kD, die
Entzündungsvermittler oder Vorläufer davon sind, Derivate der Polypeptide, beispielsweise Mutanten und Fragmente,
Verfahren zu ihrer Herstellung, Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Hybridvektoren, die für die genannten Polypeptide
und Derivate kodieren, Wirtszellen, die mit solchen Hybridvektoren transformiert sind, polyklonale und monoklonale
Antikörper, die für die genannten Polypeptide oder deren Derivate spezifisch sind, und Antikörper-Derivate sowie
diagnostische und therapeutische Methoden für Entzündungs-Zustände und Hodgkin Lymphoma.

Patentansprüche:

1. Polypeptid mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ungefähr 160kD, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein Entzündungsvermittler oder ein Vorläufer eines Entzündungsvermittler ist, oder ein Derivat davon.
2. Polypeptid gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es menschlicher Herkunft ist, oder ein Derivat davon.
3. Polypeptid mit der Bezeichnung MRP-160 gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 aufweist, oder ein Derivat davon.
4. Derivat gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein Fragment ist.
5. Fragment gemäß Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die Aminosäuren 878 bis 1427 der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 umfaßt und der N-Terminus Wasserstoff, Acyl, die Aminosäuresequenz Asp-Gly-Ile-Asp-Lys-Leu-Asp-Ile-Glu-Phe-Gly oder die Aminosäuresequenz Met-Asp-Gly-Ile-Asp-Lys-Leu-Asp-Ile-Glu-Phe-Gly ist.
6. Derivat gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine Verbindung ist, worin Amino- und/oder Hydroxy-Funktionen glykosyliert oder acyliert sind.
7. Derivat gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein pharmazeutisch annehmbares Salz ist.
8. Derivat gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein scheinbares Molekulargewicht von 190kD aufweist.
9. Derivat gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein scheinbares Molekulargewicht von 140kD aufweist.
10. Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden oder deren Derivate gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Lösung eines solchen Polypeptids oder Derivates durch chromatographische Methoden gereinigt und, falls notwendig, die gewünschte Verbindung isoliert und/oder in ein Derivat davon umgewandelt wird.
11. Verfahren gemäß Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Lösung des Polypeptids oder Derivates ein gegebenenfalls vorgereinigter Zellextrakt, Zellüberstand oder Kulturfiltrat von stimulierten normalen menschlichen Leukozyten, menschlichen embryonalen Epithelzellen der Lunge, genetisch veränderten Mikroorganismen oder kontinuierlichen Säugetier-Zelllinien ist.
12. Verfahren gemäß Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Lösung des Polypeptids oder Derivates erhalten wird, indem man transformierte Wirtszellen, die die gewünschten Verbindungen exprimieren, unter Bedingungen kultiviert, die die Expression heterologer Polypeptide ermöglichen.
13. Desoxyribonukleinsäure (DNA), **dadurch gekennzeichnet**, daß sie für ein Polypeptid oder ein Derivat davon gemäß Anspruch 1 kodiert, oder eine Mutante oder ein Fragment einer solchen DNA.
14. DNA gemäß Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie für MRP-160 der Nukleotid-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 kodiert, oder eine Mutante oder ein Fragment einer solchen DNA.
15. DNA gemäß Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie die Nukleotide 2756 bis 4414 einer DNA der Nukleotid-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 umfaßt.
16. DNA, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie mit einer DNA, Mutante oder einem Fragment davon gemäß Anspruch 13 hybridisiert.
17. DNA gemäß Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie genomischen Ursprungs ist.
18. Verfahren zur Herstellung einer DNA, einer Mutante oder eines Fragmentes davon gemäß Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß man transformierte Wirtszellen, die die gewünschten Verbindungen exprimieren, kultiviert und, falls notwendig, die gewünschte DNA daraus isoliert.
19. Verfahren gemäß Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
 - a) Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) aus geeigneten Zellen isoliert, die gewünschte mRNA auswählt, einzelsträngige komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA), die zu dieser mRNA komplementär ist, und dann doppelsträngige cDNA herstellt, oder
 - b) cDNA aus einer cDNA-Bibliothek isoliert und die gewünschte cDNA auswählt, oder
 - c) genomische DNA aus geeignetem menschlichem Gewebe isoliert und die gewünschte DNA isoliert, und
 - d) die doppelsträngige DNA aus Stufe a), b) oder c) in einen geeigneten Expressionsvektor einbaut,
 - e) geeignete Wirtszellen mit dem erhaltenen Hybridvektor transformiert,

- f) transformierte Wirtszellen, die die gewünschte DNA enthalten, auswählt und von nicht transformierten Wirtszellen abtrennt, und
 - g) gegebenenfalls die gewünschte DNA isoliert und/oder in eine Mutante oder in ein Fragment davon umwandelt.
20. Verfahren zur Herstellung einer DNA, einer Mutante oder eines Fragmentes davon gemäß Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß die gewünschten Verbindungen chemisch synthetisiert werden.
 21. Hybridvektor, **dadurch gekennzeichnet**, daß er eine DNA, eine Mutante oder ein Fragment davon gemäß Anspruch 13, die wirksam mit Expressions-Kontrollsequenzen verknüpft sind, enthält.
 22. Hybridvektor gemäß Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß er eine DNA der Nukleotid-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, eine Mutante oder ein Fragment davon umfaßt.
 23. Hybridvektor gemäß Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß er die Nukleotide 2765 bis 4414 einer DNA der Nukleotid-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 umfaßt.
 24. Hybridvektor gemäß Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß er der Vektor pMRP160 ist.
 25. Hybridvektor gemäß Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß er der Vektor pMRP160_{ex} ist.
 26. Hybridvektor gemäß Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß er der Vektor pMRP70_{PL} ist.
 27. Transformierte Wirtszelle, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie ein Polypeptid oder Derivat davon gemäß Anspruch 1 exprimiert.
 28. Wirtszelle gemäß Anspruch 27, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie mit einem Hybridvektor gemäß Anspruch 21 transformiert ist.
 29. Wirtszelle gemäß Anspruch 27, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine Zelle des Genus *Escherichia coli* ist.
 30. Wirtszelle gemäß Anspruch 27, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie aus einem Säugetier stammt.
 31. Wirtszelle gemäß Anspruch 30, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine Eierstock-Zelle des chinesischen Hamsters (CHO-Zelle) ist.
 32. Verfahren zur Herstellung einer Wirtszelle gemäß Anspruch 27, **dadurch gekennzeichnet**, daß man eine geeignete Zelle mit einem Hybridvektor durch Elektroporation, Kalziumbehandlung, Mikroinjektion oder Protoplastenverschmelzung, gegebenenfalls in Gegenwart von Hilfsstoffen, transformiert und die transformierte Zelle auswählt.
 33. Verwendung eines Polypeptids oder Derivates davon gemäß Anspruch 1 für die Behandlung von Entzündungs-Zuständen.
 34. Pharmazeutische Zusammensetzung, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine therapeutisch wirksame Menge eines Polypeptids oder Derivates davon gemäß Anspruch 1 und einen pharmazeutisch verwendbaren Träger umfaßt.
 35. Polyklonaler oder monoklonaler Antikörper, **dadurch gekennzeichnet**, daß er für ein Polypeptid mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ungefähr 160 kD, das ein Entzündungsvermittler oder ein Vorläufer eines Entzündungsvermittlers ist, oder ein Derivat davon spezifisch ist, oder ein Derivat eines solchen Antikörpers, das die Spezifität des Antikörpers, von dem es abgeleitet ist, behält.
 36. Polyklonaler oder monoklonaler Antikörper gemäß Anspruch 35, **dadurch gekennzeichnet**, daß er für MRP-160 spezifisch ist, oder ein Derivat davon.
 37. Polyklonaler oder monoklonaler Antikörper gemäß Anspruch 35, **dadurch gekennzeichnet**, daß er für rMRP-70 spezifisch ist, oder ein Derivat davon.
 38. Polyklonaler oder monoklonaler Antikörper gemäß Anspruch 35, **dadurch gekennzeichnet**, daß er für ein Fragment von MRP-160 spezifisch ist, oder ein Derivat davon.
 39. Polyklonaler Antikörper gemäß Anspruch 35, **dadurch gekennzeichnet**, daß er ein für rMRP-70 spezifischer Ratten-Antikörper ist.
 40. Derivat eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers gemäß Anspruch 35, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein Antikörperfragment, ein Konjugat des Antikörpers mit einem Enzym, einem fluoreszierenden Markierstoff, einem chemilumineszierenden Markierstoff, einem Metallchelat, einem paramagnetischen Teilchen, mit Avidin oder mit Biotin, oder ein radioaktiv markierter Antikörper ist.
 41. Verfahren zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers oder Derivates davon gemäß Anspruch 35, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein geeignetes Säugetier oder Vogel mit einem Polypeptid mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ungefähr 160 kD, das ein Entzündungsvermittler oder ein Vorläufer eines Entzündungsvermittlers ist, oder mit einem Derivat davon immunisiert, Blutserum des immunisierten Säugetiers oder Eier des immunisierten Vogels sammelt und, falls notwendig, den Antikörper isoliert und/oder in ein Derivat davon umwandelt.

42. Verfahren zur Herstellung eines monoklonalen Antikörpers oder Derivates davon gemäß Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß Hybridomazellen, die die genannten Antikörper ausscheiden, *in vitro* oder *in vivo* vermehrt werden und, falls notwendig, der Antikörper isoliert und/oder in ein Derivat davon umgewandelt wird.
43. Hybridomazelle, dadurch charakterisiert, daß die Antikörper gemäß Anspruch 35 ausscheiden.
44. Verfahren zur Herstellung einer Hybridomazelle gemäß Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß ein geeignetes Säugetier mit einem Polypeptid mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ungefähr 160 kD, das ein Entzündungsvermittler oder ein Vorläufer eines Entzündungsvermittlers ist, oder mit einem Derivat davon immunisiert, Antikörper-produzierende Zellen dieses Säugetiers mit Zellen einer kontinuierlichen Zelllinie verschmilzt, durch Verschmelzung erhaltene Hybridzellen kloniert und Zellklone, die die gewünschten Antikörper ausscheiden, auswählt.
45. Verwendung eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers gemäß Anspruch 35 für die qualitative und quantitative Bestimmung von Polypeptiden mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ungefähr 160 kD, die Entzündungsvermittler oder Vorläufer eines Entzündungsvermittlers sind, oder von Derivaten davon.
46. Verwendung eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers gemäß Anspruch 35 für die Diagnose von Entzündungs-Zuständen.
47. Verwendung eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers gemäß Anspruch 35 für die Diagnose oder Behandlung von Hodgkin Lymphoma.
48. Prüfausrüstung für die qualitative und quantitative Bestimmung von Polypeptiden mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ungefähr 160 kD, die Entzündungsvermittler oder Vorläufer eines Entzündungsvermittlers sind, oder von Derivaten davon, dadurch gekennzeichnet, daß sie polyklonale oder monoklonale Antikörper gemäß Anspruch 35 und gegebenenfalls andere monoklonale oder polyklonale Antikörper und/oder Zusatzstoffe umfaßt.
49. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine therapeutisch wirksame Menge eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers oder Derivates davon gemäß Anspruch 35 und einen pharmazeutisch verwendbaren Träger umfaßt.

Die Erfindung betrifft Polypeptide mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 160 kD (1 D = 1 Dalton = $1,66 \times 10^{-24}$ g), die Entzündungsüberträger oder Vorläufer von Entzündungsüberträgern sind, deren Derivate wie z. B. Mutanten und Fragmente, Prozesse zu ihrer Herstellung, DNAs und Hybridvektoren, welche die genannten Polypeptide und Derivate kodieren, und Wirtszellen, die mit derartigen Hybridvektoren transformiert sind, polyklonale und monoklonale Antikörper, die für die genannten Polypeptide oder ihre Derivate spezifisch sind, und Antikörper-Derivate sowie diagnostische und therapeutische Methoden für Entzündungszustände und Hodgkinsche Lymphome.

Cytokine sind biologisch aktive, lösliche Polypeptid-Überträger (Mediatoren), welche die Differenzierung, Aktivierung und Vermehrung verschiedener Zelltypen des Immunsystems kontrollieren, zum Beispiel die Induktion oder Modulation von Makrophagenfunktionen. Beispiele für Cytokine sind die gut charakterisierten Interferone, Interleukine und der das Koloniewachstum stimulierende Faktor sowie der Makrophagenmigrationshemmfaktor (MIF) und der Makrophagenaktivierungsfaktor (MAF), die Makrophagenhemmungs- bzw. -aktivierungseigenschaften aufweisen. Cytokinen sind zahlreiche Aktivitäten zugeschrieben worden, obwohl wenige davon auf einzelne Moleküle zurückgeführt werden können. Beispielsweise wird der humane MIF, den man sich als aus einer Gruppe von Polypeptiden bestehend denkt, *in vitro* in einem Test definiert, der die Hemmung der zufälligen Makrophagenmigration mißt. *In vivo* spielt der humane MIF eine wichtige Rolle im Frühverlauf zellulärer Immunreaktionen („verzögerte Überempfindlichkeit“) durch seine Übertragung von Makrophagenfunktionen. Im allgemeinen führt die erste Einwirkung eines Antigens auf einen Patienten zu keiner merklichen Veränderung, aber der Immunstatus des Empfängers verändert sich deutlich. Nach dem zweiten Kontakt mit dem Antigen zeigt sich die verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion durch die Infiltration von Zellen, beginnend mit einer perivaskulären Akkumulation von Lymphozyten und Monozyten an der Stelle, wo sich das Antigen befindet. Einige dieser Zellen sind infolge des ersten Kontakts mit dem Antigen spezifisch sensibilisiert. Diese Zellen reagieren mit dem Antigen, was zur Freisetzung von Lymphokinen und zur Anziehung und Retention großer Mengen nichtsensibilisierter Zellen führt. Insbesondere nimmt man an, daß die Produktion von MIF zur Anziehung von Monozyten führt, die durch das Endothel der Blutgefäßwand hindurch in das umgebende Gewebe eintreten. Gleichzeitig mit dieser Infiltration differenzieren sich die Monozyten zu Gewebemakrophagen. Das makroskopische Erscheinungsbild, das bei verzögerter Überempfindlichkeit zu beobachten ist, besteht in einer Schwellung am Kontaktort mit dem Antigen und einer Rötung, die durch die Erweiterung der darunterliegenden Blutgefäße verursacht wird. Unter normalen Bedingungen klingt die Entzündungsreaktion nach etwa zwei bis drei Tagen ab, wenn mögliche Gewebeschäden repariert worden sind. Aus unbekannten Gründen können jedoch Entzündungen chronisch werden und zu ausgedehnten Gewebeschäden führen, z. B. zu Rheumatoidarthritis. Eine mögliche Erklärung für die Entstehung einer chronischen Entzündung könnte sein, daß am Anfang die Differenzierung der infiltrierten Makrophagen außer Kontrolle geraten ist.

Ziel der Erfindung

Ein Ziel der Erfindung besteht darin, Polypeptide, insbesondere humane Polypeptide, die Entzündungsüberträger oder Vorläufer von Entzündungsüberträgern sind, und ihre Derivate in hoher Reinheit und ausreichender Menge zu erzeugen sowie Verfahren zu ihrer Herstellung bereitzustellen. Das Problem der industriellen Polypeptidsynthese läßt sich durch die Methoden der DNA-Rekombinationstechnik lösen. Ein weiteres Ziel der Erfindung ist daher die Erzeugung von DNAs und Hybridvektoren, welche die gewünschten Polypeptide und ihre Derivate kodieren, sowie von Wirten, die mit derartigen Vektoren transformiert sind. Weitere Ziele sind Produktionsverfahren für die genannten DNAs, Vektoren und transformierten Wirtszellen.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide sind verwendbar, um zu einem besseren Verständnis des mononuklearen Phagozytensystems in klinisch wichtigen Gebieten zu gelangen, wie z. B. der Widerstandsfähigkeit gegen Infektion, der Kontrolle von Metastasen, Entzündungsprozessen, und der Wiederherstellung von Gewebe. Dementsprechend sind ein weiteres Ziel der Erfindung pharmazeutische Präparate, die Polypeptide oder deren Derivate enthalten, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung. Außerdem sind die erfindungsgemäßen Polypeptide und Derivate für die Untersuchung, Identifikation und Produktion von Antagonisten verwendbar, die als Medikamente gegen Entzündungen eingesetzt werden können.

Ein weiteres Ziel der Erfindung besteht in die Entwicklung spezifischer Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Polypeptide bzw. Derivate. Solche Antikörper können zur Diagnose von Entzündungszuständen und zur Überwachung der Behandlung solcher Zustände eingesetzt werden. Ferner sind die Antikörper für die Diagnose und Behandlung Hodgkinscher Lymphome verwendbar.

Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung betrifft Polypeptide, insbesondere humane Polypeptide, mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 160kD ($1\text{D} = 1\text{ Dalton} = 1,66 \times 10^{-24}\text{g}$), die Entzündungsüberträger oder Vorläufer von Entzündungsüberträgern sind, sowie ihre Derivate.

Überträger (Mediatoren) von Entzündungen sind chemische Signalmoleküle, die Entzündungsreaktionen induzieren. Vorläufer von Polypeptid-Überträgern sind Vorstufen von Überträgern, d. h. Polypeptide, die nach ihrer Produktion verarbeitet oder beschnitten werden, z. B. durch Abschneiden bestimmter terminaler Aminosäuresequenzen und/oder durch Glycosylierung, und dadurch in die aktiven Überträger umgewandelt worden oder, falls der Vorläufer selbst ein aktiver Überträger ist, ihre Überträger-Aktivität beibehalten.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide und Derivate spielen eine wichtige Rolle in den immunologischen Prozessen, die an Entzündungszuständen beteiligt sind. Die Entzündungsüberträger-Aktivität der beanspruchten Polypeptide kann zum Beispiel durch ihre Fähigkeit zur Induktion einer örtlichen Entzündung, beispielsweise bei einem normalen Meerschweinchen, nachgewiesen werden.

Im allgemeinen läßt sich das scheinbare Molekulargewicht eines Polypeptids unbekannter Struktur nach herkömmlichen Methoden bestimmen, z. B. durch Sedimentationsanalyse und Bestimmung des Diffusionskoeffizienten oder durch gelelektrophoretische Methoden, insbesondere durch Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS-PAGE).

Im besonderen betrifft die Erfindung ein Polypeptid mit der Bezeichnung MRP-160, das ein Entzündungsüberträger oder Vorläufer eines Entzündungsüberträgers ist, mit der in SEQ ID NO: 1 angegebenen Aminosäuresequenz, oder Derivate dieses Polypeptids.

Das berechnete Molekulargewicht vom MRP-160 beträgt 160989.

Erfindungsgemäße Derivate sind Mutanten der erfindungsgemäßen Polypeptide, insbesondere Mutanten der Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 1 angegebenen Aminosäuresequenz, wobei eine oder mehrere einzelne Aminosäuren, insbesondere nicht mehr als 10% der Aminosäuren, deletiert oder durch andere Aminosäuren ersetzt oder zusätzliche Aminosäuren inseriert werden.

Weiterhin sind erfindungsgemäße Derivate Fragmente eines erfindungsgemäßen Polypeptids oder einer seiner Mutanten, insbesondere Fragmente eines Polypeptids mit der in SEQ ID NO: 1 angegebenen Aminosäuresequenz oder einer Mutante davon, die mindestens 15 aufeinanderfolgende Aminosäuren enthalten.

Bevorzugt wird ein Fragment, das die Aminosäuren 878 bis 1427 der in SEQ ID NO: 1 angegebenen Aminosäuresequenz enthält, wobei das N-terminale Ende Wasserstoff, Acyl, die Aminosäuresequenz Asp-Gly-Ile-Asp-Lys-Leu-Asp-Ile-Glu-Phe-Gly oder die Aminosäuresequenz Met-Asp-Gly-Ile-Asp-Lys-Leu-Asp-Ile-Glu-Phe-Gly ist. Das Fragment, das die N-terminale Aminosäuresequenz Met-Asp-Gly-Ile-Asp-Lys-Leu-Asp-Ile-Glu-Phe-Gly enthält, wird mit rMRP-70 bezeichnet.

Das vorausgesagte Molekulargewicht des Fragments mit der Bezeichnung rMRP-70 ist 64714, aber bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese wandert dieses Peptid wie ein Peptid mit dem scheinbaren Molekulargewicht von 70kD im Vergleich zu den Standard-Markerproteinen.

Außerdem sind erfindungsgemäße Derivate Verbindungen, die aus einem Polypeptid, einer Mutante oder einem Fragment gemäß der Erfindung abgeleitet sind, insbesondere aus MRP-160, einer Mutante oder einem Fragment davon, wobei funktionelle Gruppen, z. B. Amino-, Hydroxyl-, Mercapto- oder Carboxylgruppen, derivatisiert, z. B. glycosyliert, acyliert, amidiert oder verestert werden. In glycosylierten Derivaten wird ein Kohlenwasserstoffrest oder ein Oligosaccharid mit Asparagin, Serin und/oder Threonin verbunden. Acylierte Derivate werden an Aminogruppen, besonders an der N-terminalen Aminogruppe, oder an Hydroxylgruppen, besonders von Tyrosin oder Serin, durch die Acylgruppe einer natürlich auftretenden organischen oder anorganischen Säure substituiert, z. B. Ameisensäure, Essigsäure, Phosphorsäure oder Schwefelsäure. Bevorzugt werden glycosylierte erfindungsgemäße Derivate.

Weitere erfindungsgemäße Derivate sind Salze, insbesondere pharmazeutisch akzeptierbare Salze, zum Beispiel Metallsalze wie Alkalimetall- und Erdalkalimetallsalze, etwa Natrium-, Kalium-, Magnesium-, Kalzium- oder Zinksalze oder Ammoniumsalze, die mit Ammoniak oder einem geeigneten organischen Amin gebildet werden, wie z. B. mit einem niederen Alkylamin, etwa Triethylamin, einem niederen Hydroxyethylamin, etwa 2-Hydroxyethylamin u. ä.

Bevorzugt werden Derivate von erfindungsgemäßen Polypeptiden mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 190 kD oder mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 140 kD, die durch transfizierte Zellen oder natürliche Zellen wie Endothelzellen produziert werden. Sie können mittels Standardverfahren, wie z. B. Western Blots, beobachtet werden.

Die Erfindung betrifft außerdem Herstellungsprozesse für Polypeptide, die Entzündungsüberträger oder Vorläufer von Entzündungsüberträgern sind, d. h. natürliche, rekombinante oder synthetische Polypeptide und Derivate gemäß der Erfindung. In einer Ausführungsform der Erfindung werden derartige Verbindungen nach einem Verfahren hergestellt, bei dem eine Lösung, die erfindungsgemäße Polypeptide oder Derivate enthält, z. B. einen wahlweise vorgereinigten Zelloxtrakt, Zellenüberstand oder ein Kulturfiltrat von stimulierten normalen menschlichen Leukozyten oder von gentechnisch bearbeiteten Mikroorganismen oder kontinuierlichen Säugetierzelllinien, mittels chromatographischer Methoden gereinigt, und nötigenfalls werden die Verbindungen isoliert und in ihre Derivate umgewandelt.

Zelloxtrakte, Zellenüberstände und Kulturfiltrate stimulierter normaler menschlicher Leukozyten, die natürliche erfindungsgemäße Polypeptide enthalten, werden hergestellt, wie beispielsweise in der Europäischen PA 0 162 812 für MIF beschrieben. Im einzelnen werden normale humane mononukleare Zellen durch geeignete Zusätze, z. B. Concavalin A oder Phytohemagglutinin, zur Produktion von Lymphokinen angeregt und nach üblichen Verfahren kultiviert. Wahlweise können dann Zelloxtrakte, Zellenüberstände oder Kulturfiltrate durch Immunoaffinitätschromatographie vorgereinigt werden. Chromatographische Methoden, die zur Präparation der gewünschten Verbindungen in Betracht gezogen werden, sind die Ionenaustauschchromatographie, die Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, die Gelfiltration, die Ausschlusschromatographie, die (Immuno-) Affinitätschromatographie, die Chromatographie auf Hydroxylapatit, die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie und dergleichen.

Ein geeignetes Trägermaterial für die Ionenaustauschchromatographie kann organischen oder anorganischen Ursprungs sein, z. B. vernetzte Agarose, Dextran, Polyacrylamid, Styrol-/Divinylbenzol-Mischpolymerisat, Zellulose o.ä. Dieses Trägermaterial trägt basische funktionelle Gruppen, z. B. tertiäre Aminofunktionen, quaternäre Ammoniumgruppen, oder saure funktionelle Gruppen, z. B. Carbonsäure- oder Sulfonsäurereste. Beispiele für bevorzugte Ionenaustauscher sind diejenigen mit Diethylaminoethyl- (DEAE) oder Diethyl-2-hydroxyethyl-ammonioethyl-Funktionsgruppen und diejenigen mit Sulfopropyl- (SP-) oder Carboxymethyl- (CM-) Funktionsgruppen, die an geeignete Träger für normale Flüssigkeitschromatographie, schnelle Protein-Flüssigkeitschromatographie (FPLC) oder Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) gebunden sind. Die Trennungen und Reinigungen mittels Ionenaustauschchromatographie werden nach feststehenden Verfahrensweisen durchgeführt, z. B. in wässrigen Pufferlösungen von pH 5 bis pH 9, die variable Salzmenge enthalten, z. B. Natriumchlorid.

Die Umkehrphasenchromatographie wird in Trägermaterial auf Siliziumdioxidbasis durchgeführt, das hydrophobe Gruppen trägt, z. B. Alkylgruppen mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise mit 4, 8, 12 oder 18 Kohlenstoffatomen, oder Mischungen von Alkylgruppen mit 1 und 8 bzw. 12 und 18 Kohlenstoffatomen, oder Phenylgruppen. Mit dieser Methode verwandt ist die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie, bei der Agarose oder ein verwandtes Material eingesetzt wird, das mit Alkylgruppen bis zu 12 Kohlenstoffatomen und/oder mit Phenylgruppen beschichtet ist. Diese chromatographischen Techniken werden unter Verwendung der FPLC oder der HPLC eingesetzt. Lösungsmittel zur Verarbeitung der erfindungsgemäßen Polypeptide auf Umkehrphasenmaterial auf Siliziumdioxidbasis sind wässrige Säuren, z. B. wässrige Trifluoressigsäure, die ansteigende Mengen eines polaren, mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittels enthält, z. B. Acetonitril, niedere Alkohole wie z. B. Methanol, Ethanol oder Propanol, Tetrahydrofuran und dergleichen, vorzugsweise aber Acetonitril.

Die Affinitätschromatographie wird ebenfalls für die Reinigung der erfindungsgemäßen Polypeptide ins Auge gefasst, wobei ein geeignetes Trägermaterial verwendet wird, z. B. vernetzte Agarose, Dextran oder Polyacrylamid, die Moleküle mit hoher Affinität zu einem erfindungsgemäßen Polypeptid oder Derivat, zu Mutanten, Fragmenten oder deren Derivaten tragen, beispielsweise Antikörper, insbesondere polyklonale oder monoklonale Antikörper (MAbs), wie z. B. spezifische MAbs gegen humanen MIF.

Die bevorzugten chromatographischen Methoden sind die Immunoaffinitätschromatographie, die Ionenaustauschchromatographie mit Trägern, die Sulfonpropylgruppen tragen, und die Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).

Die erfindungsgemäßen Verbindungen werden durch die üblichen Verfahren isoliert, beispielsweise durch Filtration oder Ultrafiltration, Dialyse, Auflösung und Wiederausfällen in geeigneten Salz- oder Pufferlösungen und Lösungsmittelgemischen, Eindampfen von Lösungsmitteln, Lyophilisierung und dergleichen.

Erfindungsgemäße Mutanten entstehen durch spontane oder chemisch induzierte Mutationen auf der DNA-Ebene oder durch Austausch von Aminosäuren mittels chemischer Synthese.

Erfindungsgemäße Fragmente entstehen durch spontane oder chemisch induzierte Mutationen auf der DNA-Ebene, wodurch ein Triplett, das eine Aminosäure kodiert, in ein Stoppcodon umgewandelt wird, oder auf der Peptid-Ebene durch chemische oder enzymatische Bindungsaufspaltung. Geeignete Enzyme für die Herstellung erfindungsgemäßer Fragmente sind zum Beispiel Proteasen. Beispielsweise können Papain, Trypsin, α -Chymotrypsin, Thermolysin, Pepsin, Subtilisin, Endoproteinase Lys-C von *Lysobacter enzymogenes*, V8-Protease von *Staphylococcus aureus* oder verwandte Proteasen einer Lösung eines erfindungsgemäßen Polypeptids zugesetzt und das entstehende Fragmentgemisch kann durch chromatographische Methoden getrennt werden, z. B. durch Gelfiltration und/oder Umkehrphasen-HPLC.

Extrakte, Zellenüberstände und Kulturfiltrate von gentechnisch bearbeiteten Mikroorganismen oder kontinuierlichen Säugetierzelllinien, die erfindungsgemäße rekombinante Polypeptide oder deren Derivate gemäß der Erfindung enthalten, werden durch DNA-Rekombinationstechniken gewonnen und, wie oben erörtert, vorgereinigt. Im einzelnen können erfindungsgemäße Polypeptide und deren Derivate hergestellt werden, indem transformierte Wirtszellen, die erfindungsgemäße Polypeptide oder deren Derivate exprimieren, unter Bedingungen kultiviert werden, welche die Expression heterologer Polypeptide erlauben, und nötigenfalls die gewünschten Verbindungen isoliert und/oder in ihre Derivate umgewandelt werden. Die Schritte, die mit der Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide und Derivate durch DNA-Rekombinationstechniken verbunden sind, werden weiter unten ausführlicher diskutiert.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden die erfindungsgemäßen Polypeptide und deren Derivate, insbesondere Fragmente, durch chemische Methoden synthetisiert, z. B. durch Kondensationsreaktionen, wie sie beispielsweise von M. Bodanszky, in „Principles of Peptide Synthesis“ (Prinzipien der Peptidsynthese, Springer 1984) beschrieben wurden.

Fragmente werden z. B. durch eine Festphasenmethode synthetisiert, wobei eine N-geschützte Aminosäure an ein geeignetes Harz gekoppelt, die Schutzgruppe entfernt, eine zweite N-geschützte Aminogruppe an die erste Aminosäure ankondensiert und

der Zyklus von Schutzentfernung/Kondensation mit weiteren N-geschützten Aminosäuren so lange wiederholt wird, bis der Peptidrest der gewünschten Verbindung vollständig ist, und schließlich dieser Peptidrest vom Harz abgespalten und sein Schutz entfernt wird. In ähnlicher Weise können anstelle einzelner N-geschützter Aminosäuren kurze N-geschützte Oligopeptide eingesetzt werden. Geeignete Harze, Schutzgruppen, Kondensationsreagenzien und Reaktionsbedingungen sind dem Fachmann gut bekannt.

Die Erfindung betrifft außerdem DNAs, die ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder dessen Derivate kodieren, Mutanten solcher DNAs, zum Beispiel DNAs, bei denen ein oder mehrere, insbesondere ein, zwei, drei oder vier Nukleotide mutiert sind, sowie Fragmente derartiger DNAs, die aus mindestens 15 Nukleotiden bestehen.

Definitionsgemäß umfassen solche DNAs kodierende einzelsträngige DNAs, doppelsträngige DNAs, die aus den genannten kodierenden DNAs und aus dazu komplementären DNAs bestehen, oder diese komplementären (einzelssträngigen) DNAs selbst. Im besonderen betrifft die Erfindung eine DNA, die MRP-160 mit der in SEQ ID NO: 1 angegebenen Nukleotidsequenz kodiert, sowie Mutanten und Fragmente einer solchen DNA.

Im besonderen betrifft die Erfindung ein DNA-Fragment, das die Nukleotide 2765 bis 4414 einer DNA mit der in SEQ ID NO: 1 angegebenen Nukleotidsequenz umfaßt.

Die Erfindung betrifft auch DNAs, die mit einer DNA, einer Mutante oder einem Fragment davon gemäß der Erfindung hybridisieren.

Weiterhin betrifft die Erfindung DNAs, deren Mutanten oder Fragmente gemäß der Erfindung, die genomischen Ursprungs sind. Die erfindungsgemäßen DNAs können beispielsweise durch Kultivierung eines transformierten Wirts und nötigenfalls Isolieren der gewünschten DNA aus diesem Wirt oder durch chemische Synthese mittels Nukleotidkondensation hergestellt werden. Insbesondere können solche DNAs wie folgt hergestellt werden:

- a) Isolierung von mRNA aus geeigneten Zellen, zum Beispiel aus menschlichen einkernigen Leukozyten oder menschlichen embryonalen Lungenepithelzellen, Selektion der gewünschten mRNA, zum Beispiel durch Hybridisierung mit einer DNA-Sonde oder durch Expression in einem geeigneten Expressionssystem und Auswahl nach der Expression des gewünschten Polypeptids, Herstellung einer zu dieser mRNA komplementären einzelsträngigen cDNA und danach einer doppelsträngigen cDNA aus der einzelsträngigen cDNA oder
 - b) Isolierung von cDNA aus einer cDNA-Bibliothek und Selektion der gewünschten cDNA, zum Beispiel durch Verwendung einer DNA-Sonde oder durch Verwendung eines geeigneten Expressionssystems und Auswahl nach der Expression des gewünschten Polypeptids oder
 - c) Isolierung einer genomischen DNA aus geeignetem menschlichem Gewebe, zum Beispiel aus der Plazenta oder aus fötalen Leberzellen, und Selektion der gewünschten DNA, zum Beispiel durch Anwendung einer DNA-Sonde oder durch Verwendung eines geeigneten Expressionssystems und Auswahl nach der Expression des gewünschten Polypeptids und
 - d) Einbau der doppelsträngigen DNA von Schritt a), b) oder c) in einen geeigneten Expressionsvektor,
 - e) Transformation geeigneter Wirtszellen mit dem gewonnenen Hybridvektor,
 - f) Selektion transformierter Wirtszellen, welche die gewünschte DNA enthalten, aus untransformierten Wirtszellen und, falls erforderlich,
 - g) Isolierung der gewünschten DNA und/oder Umwandlung der DNA in eine Mutante oder ein Fragment dieser DNA.
- Polyadenylierte Messenger-RNA (Schritt a) wird nach bekannten Methoden aus den geeigneten Zellen isoliert, zum Beispiel aus menschlichen einkernigen Leukozyten oder aus menschlichen embryonalen Lungenepithelzellen. Beispielsweise können die Leukozyten aus frischem menschlichem Blut gewonnen werden, zum Beispiel aus hautartigen Schichten, die aus weißen Blutkörperchen bestehen, oder aus Leukozyten einer bestehenden kontinuierlichen Zelllinie, die in Kultur entwickelt werden kann. Die Isolationsverfahren umfassen zum Beispiel die Homogenisierung stimulierter Leukozyten in Gegenwart eines Detergens und eines Ribonukleasehemmstoffs, z. B. Heparin, Guanidinisothiocyanat oder Mercaptoethanol, Extraktion der mRNA mit geeigneten Chloroform-Phenol-Mischungen, wahlweise in Gegenwart von Salz- oder Pufferlösungen, Detergenzien und/oder kationischen Chelatbildnern, und das Ausfällen der mRNA aus der verbleibenden wäßrigen, salzhaltigen Base mit Ethanol, Isopropanol oder dergleichen. Die isolierte mRNA kann durch Zentrifugieren in einem Cäsiumchloridgradienten mit anschließender Ethanol-Ausfällung und/oder durch chromatographische Methoden weiter gereinigt werden, zum Beispiel durch Affinitätschromatographie, etwa Chromatographie an Oligo(dT)-Zellulose oder an Oligo(U)-Sephadex. Vorzugsweise wird eine solche gereinigte Gesamt-mRNA durch Gradientenzentrifugation nach der Größe fraktioniert, zum Beispiel in einem linearen Saccharosegradienten, oder durch Chromatographie an geeigneten Größenfraktionierungssäulen, z. B. an Agarosegelen.

Die gewünschte mRNA wird durch direkte Klassierung der mRNA mit einer DNA-Sonde oder durch Translation in geeigneten Zellen oder zellfreien Systemen und Klassierung der erhaltenen Polypeptide selektiert.

Die Selektion der gewünschten mRNA wird vorzugsweise unter Verwendung einer DNA-Hybridisierungssonde erreicht, wodurch der zusätzliche Translationsschritt vermieden wird. Geeignete DNA-Sonden sind DNAs mit bekannter Nukleotidsequenz, die aus mindestens 17 Nukleotiden bestehen, zum Beispiel synthetische DNAs, cDNAs, die aus einer mRNA abgeleitet sind, welche die gewünschten Polypeptide in einer Tierart kodiert, deren DNA Sequenzhomologien mit der menschlichen DNA aufweist, oder genomische DNA-Fragmente, die zum Beispiel aus benachbarten DNA-Sequenzen bestehen, die aus einer natürlichen Quelle oder aus einem gentechnisch veränderten Mikroorganismus isoliert werden. Synthetische DNA-Sonden werden nach bekannten Methoden synthetisiert, wie sie im folgenden ausführlich beschrieben werden, vorzugsweise durch schrittweise Kondensation unter Anwendung der Festphasen-Phosphotriester-, Phosphitriester- oder Phosphoramidit-Methode, zum Beispiel Kondensation von Dinukleotid-Kopplungseinheiten nach der Phosphotriester-Methode.

Diese Methoden werden an die Synthese von Gemischen der gewünschten Oligonukleotide angepaßt, indem Mischungen von zwei, drei oder vier Nukleotiden dA, dC, dG und/oder dT in geschützter Form oder die entsprechenden Dinukleotid-Kopplungseinheiten in den passenden Kondensationsschritt eingesetzt werden, wie von Y. Ike u. a. (Nucleic Acids Research 11, 477, 1983) beschrieben.

Zur Hybridisierung werden die DNA-Sonden markiert, z. B. werden sie durch die gut bekannte Kinasereaktion radioaktiv markiert. Die Hybridisierung der größenfraktionierten mRNA mit den DNA-Sonden, die eine Markierung enthalten, wird nach bekannten

Verfahrensweisen durchgeführt, d.h. in Puffer- und Salzlösungen, die Zusätze enthalten, beispielsweise Calciumchelatbildner, viskositätsregulierende Verbindungen, Proteine, irrelevante DNA und dergleichen, bei Temperaturen, welche die selektive Hybridisierung begünstigen, etwa zwischen 0°C und 80°C, beispielsweise zwischen 25°C und 50°C oder bei etwa 65°C, vorzugsweise bei einer Temperatur, die um 20°C unter der Schmelztemperatur der hybriden doppelsträngigen DNA liegt. Fraktionierte mRNA kann in Zellen translatiert werden, z.B. in Froschzellen, oder in zellfreie Systeme, zum Beispiel in Retikulozytenlysate oder Weizenkeimextrakte. Die erhaltenen Polypeptide werden nach der Überträgeraktivität oder nach der Reaktion mit Antikörpern ausgelesen, die gegen den nativen Überträger gebildet worden, zum Beispiel in einem Immuntest mit Fluoreszenzmarkern. Solche Immuntests und die Herstellung polyklonaler und monoklonaler Antikörper sind dem Fachmann gut bekannt und werden dementsprechend angewendet.

Die Herstellung einer einzelsträngigen komplementären DNA (cDNA) aus der selektierten mRNA-Matrize ist dem Fachmann gut bekannt, desgleichen die Herstellung einer doppelsträngigen DNA aus einer einzelsträngigen DNA. Die mRNA-Matrize wird mit einer Mischung aus Desoxynukleosidtriphosphaten, wahlweise radioaktiv markierten Desoxynukleosidtriphosphaten (um das Reaktionsergebnis klassieren zu können), einer Startersequenz, wie z.B. einem Oligo-dT-Rest, der mit dem Poly(A)-Schwanz der mRNA hybridisiert, und einem geeigneten Enzym, wie etwa einer Umkehrtranskriptase, z.B. von einem Vogelmyeloblastosevirus (AMV), inkubiert. Nach dem Abbau der Matrizen-mRNA, z.B. durch alkalische Hydrolyse, wird die cDNA mit einer Mischung aus Desoxynukleosidtriphosphaten und einem geeigneten Enzym inkubiert, um eine doppelsträngige DNA zu erhalten. Geeignete Enzyme sind beispielsweise eine Umkehrtranskriptase, das Klenow-Fragment von E.coli-DNA-Polymerase I oder T4 DNA-Polymerase. Gewöhnlich wirkt eine Haarnadelstruktur, die spontan von der einzelsträngigen cDNA gebildet wird, als Starter für die Synthese des zweiten Strangs. Diese Haarnadelstruktur wird durch Aufschluß mit S1-Nuklease entfernt. Ersatzweise wird das 3'-Ende der einzelsträngigen DNA vor der Hydrolyse der mRNA-Matrize und der anschließenden Synthese des zweiten cDNA-Strangs zunächst durch homopolymere Desoxynukleotid-Schwänze erweitert.

Als Alternative dazu wird doppelsträngige cDNA aus einer cDNA-Bibliothek isoliert und die gewünschte cDNA wird ausgesondert (Schritt b). Die cDNA-Bibliothek wird aufgebaut, indem mRNA aus geeigneten Zellen, z.B. aus menschlichen einkernigen Leukozyten oder menschlichen embryonalen Lungenepithelzellen, isoliert und entsprechend der obigen Beschreibung daraus einzelsträngige und doppelsträngige cDNA hergestellt wird. Diese cDNA wird mit geeigneten Restriktionsendonukleasen aufgeschlossen und nach feststehenden Verfahren in einen Lambda-Phagen eingebaut, z.B. in Lambda-Charon 4A oder Lambda-gt 11. Die an Nitrozellulosemembranen replizierte cDNA-Bibliothek wird unter Verwendung einer DNA-Sonde aussortiert, wie weiter oben beschrieben, oder in einem geeigneten Expressionssystem exprimiert, und die erhaltenen Polypeptide werden nach der Reaktion mit einem für die gewünschten Verbindungen spezifischen Antikörper aussortiert, z.B. mit einem für Human-MIF spezifischen Antikörper.

Als weitere Möglichkeit kann genomische DNA isoliert und die gewünschte DNA kann daraus aussortiert werden (Schritt c). Genomische DNA wird nach dem Fachmann bekannten Methoden aus geeignetem menschlichen Gewebe isoliert, vorzugsweise aus menschlicher Plazenta oder menschlichen fötalen Leberzellen. Daraus wird durch Aufschluß mit geeigneten Restriktionsendonukleasen, z.B. AluI und HaeIII und Einbau in einen Lambda-Phagen, z.B. in Lambda-Charon 4A oder Lambda-gt 11, nach feststehenden Verfahren eine genomische DNA-Bibliothek hergestellt. Die an Nitrozellulosemembranen replizierte genomische DNA-Bibliothek wird mit einer DNA-Sonde aussortiert, wie weiter oben beschrieben, oder in einem geeigneten Expressionssystem exprimiert, und die erhaltenen Polypeptide werden, wie weiter oben beschrieben, aussortiert. Dem Fachmann ist eine Vielzahl von Methoden zum Einbau doppelsträngiger cDNA oder genomischer DNA in einen geeigneten Vektor bekannt (Schritt d). Zum Beispiel können durch Inkubation in Gegenwart der entsprechenden Desoxynukleosidtriphosphate und eines Enzyms wie zum Beispiel terminaler Desoxynukleotidyltransferase komplementäre homopolymere Stränge an die doppelsträngige DNA und die Vektor-DNA angelagert werden. Die Vektor-DNA und die doppelsträngige DNA werden dann durch Basenpaarung zwischen den komplementären homopolymeren Schwänzen miteinander verbunden und schließlich durch spezifische Verbindungsenzyme, wie z.B. Ligasen, ligiert. Andere Möglichkeiten sind die Anlagerung von synthetischen Linkern an die Enden der doppelsträngigen DNA oder der Einbau der doppelsträngigen DNA in den Vektor mittels Ligation stumpfer oder versetzter Enden. Geeignete Vektoren werden weiter unten ausführlich diskutiert.

Die Transformation geeigneter Wirtszellen mit dem erhaltenen Hybridvektor (Schritt e) und die Selektion transformierter Wirtszellen (Schritt f) sind dem Fachmann gut bekannt und werden weiter unten ausführlich beschrieben. Hybridvektoren und Wirtszellen können für die Produktion von DNA oder auch für die Produktion der gewünschten Polypeptide besonders geeignet sein.

Die Isolierung der gewünschten DNA, ihrer Mutanten und Fragmente gemäß der Erfindung wird durch dem Fachmann bekannte Verfahren erreicht, z.B. durch Extraktion mit Phenol und/oder Chloroform. Wahlweise kann die DNA weiter manipuliert werden, z.B. durch Behandlung mit Mutagenen, um Mutanten zu erhalten, oder durch Aufschluß mit Restriktionsenzymen zur Bildung von Fragmenten, Modifikation eines oder beider Enden, um den Einbau in den Vektor zu erleichtern, Entfernen der dazwischenliegenden Sequenzen und dergleichen.

Die Nukleotidsequenz einer erfindungsgemäßen DNA kann durch Methoden bestimmt werden, die an sich bekannt sind, z.B. durch die Maxam-Gilbert-DNA-Sequenzierungsmethode unter Verwendung von endmarkierter DNA oder durch die Didesoxy-Kettenterminationmethode von Sanger.

Die Herstellung einer DNA, ihrer Mutante oder ihres Derivats gemäß der Erfindung kann auch mit Hilfe einer chemischen Synthese erfolgen. Geeignete Synthesemethoden für DNA sind zusammenfassend von S. A. Narang (Tetrahedron 39, 3, 1983) dargestellt worden. Die bekannten Syntheseverfahren gestatten die Herstellung von Polynukleotiden von bis zu 40 Basen Länge mit guter Ausbeute, hoher Reinheit und in relativ kurzer Zeit. Geeignet geschützte Nukleotide werden nach der Phosphordiester methode (K. L. Agarwal u. a., Angew. Chemie 84, 489, 1972), der leistungsfähigeren Phosphotriester methode (C. B. Reese, Tetrahedron 34, 3143, 1972) der Phosphitriester methode (R. L. Letsinger u. a., J. Am. Chem. Soc. 98, 3655, 1976) oder der Phosphoramidit methode (S. L. Beaucage und M. H. Carruthers, Tetrahedron 22, 1859, 1981) miteinander verbunden. Eine Vereinfachung der Synthese der Oligonukleotide und Polynukleotide wird durch das Festphasenverfahren ermöglicht, bei dem die Nukleotidketten an ein geeignetes Polymer gebunden werden. H. Rink u. a. (Nucl. Acids Research 12, 6369, 1984) verwenden Trinukleotide anstelle einzelner Nukleotide und verbinden sie nach der Phosphotriester methode in der Festphasensynthese. Auf diese Weise kann innerhalb kurzer Zeit und mit guter Ausbeuten ein Polynukleotid mit bis zu 67 Basen hergestellt werden. Die

eigentliche doppelsträngige DNA wird enzymatisch aus chemisch präparierten überlappenden Oligonukleotiden von beiden DNA-Strängen aufgebaut, die durch Basenpaarung in der richtigen Anordnung zusammengehalten und dann durch das Enzym DNA-Ligase chemisch verbunden worden. Eine weitere Möglichkeit umfaßt die Inkubation überlappend einzelner Oligonukleotide aus den beiden DNA-Strängen in Gegenwart der vier erforderlichen Desoxynukleosidtriphosphate mit einer DNA-Polymerase, z. B. mit DNA-Polymerase I, dem Klenow-Fragment der Polymerase I oder der T4 DNA-Polymerase oder mit AMV-(Vogelmyeloblastosevirus-) Umkehrtranskriptase. Die beiden Oligonukleotide werden dadurch in der richtigen Anordnung durch Basenpaarung zusammengehalten und durch das Enzym mit den erforderlichen Nukleotiden ergänzt, um eine vollständige doppelsträngige DNA zu liefern (S. A. Narang u. a., Anal. Biochem. 121, 356, 1982).

Die Erfindung betrifft ferner Hybridvektoren, die, wie weiter oben definiert, aus einer DNA, einer Mutante oder einem Fragment einer DNA bestehen, welche(s) ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder Derivat kodieren, das operativ mit Expressionskontrollsequenzen verbunden ist. Besonders bevorzugt sind Hybridvektoren, die eine DNA entsprechend SEQ ID NO: 1, eine Mutante oder ein Derivat dieser DNA oder ein DNA-Fragment umfassen, das aus den Nukleotiden 2765 bis 4414 einer DNA nach SEQ ID NO: 1 besteht und operativ mit Expressionskontrollsequenzen verbunden ist.

Die erfindungsgemäßen Hybridvektoren sorgen für die Replikation und Expression der gewünschten DNA in einem geeigneten Wirt, entweder als extrachromosomales Element oder durch Integration in das Wirtschromosom. Für die Integration und Expression der erfindungsgemäßen klonierten DNA stehen mehrere mögliche Vektorsysteme zur Verfügung. Im Prinzip sind alle Vektoren geeignet, die das gewünschte Polypeptid gemäß der Erfindung in dem gewählten Wirt replizieren und exprimieren. Der Vektor wird in Abhängigkeit von den für die Transformation ins Auge gefaßten Wirtszellen ausgewählt. Im allgemeinen können solche Wirtszellen prokaryotische oder eukaryotische Mikroorganismen sein, wie z. B. Bakterien oder Hefen, oder Zellen von höherer eukaryotischer Herkunft, wie z. B. Wirbeltier-, insbesondere Säugtierzellen. Geeignete Wirtszellen werden weiter unten ausführlich erörtert. Im Prinzip umfassen die erfindungsgemäßen Hybridvektoren die DNA, wie sie weiter oben definiert wurde, einen Replikationsstartpunkt oder eine autonom replizierende Sequenz, dominante Markersequenzen, Expressionskontrollsequenzen, die für die Transkription und Translation der gewünschten DNA wesentlich sind, und wahlweise Signalsequenzen und zusätzliche Restriktionsstellen.

Ein Replikationsstartpunkt oder eine autonom replizierende Sequenz (ein DNA-Element, das extrachromosomalen Elementen Fähigkeiten zur autonomen Replikation verleiht) entsteht entweder, indem der Vektor so konstruiert wird, daß er einen exogenen Ursprung enthält, wie er z. B. aus dem Affenvirus (SV40) oder einer anderen viralen Quelle abgeleitet wird, oder durch den chromosomalen Mechanismus der Wirtszelle.

Die Marker erlauben die Selektion von Wirtszellen, die den Vektor enthalten. Selektionsmarker enthalten Gene, die Resistenz gegen Schwermetalle wie Kupfer oder gegen Antibiotika wie Tetracyclin, Ampicillin, Geneticin (G-418) oder Hygromycin verleihen, oder Gene, die einen genetischen Schaden der Wirtszellen ergänzen, wie z. B. das Fehlen von Thymidinkinase, Hypoxanthinphosphoryltransferase, Dihydrofolatreduktase o. ä.

Als Expressionskontrollsequenzen umfaßt die Vektor-DNA einen Promotor, d. h. eine DNA-Sequenz, die bewirkt, daß die RNA-Polymerase sich an die DNA bindet und die RNA-Synthese startet, Ribosomen-Bindungsstellen, d. h. Sequenzen, die für die Auslösung von Translations-, Transkriptions- und Translationsstoppsignalen notwendig sind, und Sequenzen, die zur Stabilisierung der mRNA notwendig sind, und wahlweise Verstärker und weitere Regulationssequenzen.

Es kann eine breite Vielfalt von Promotionssequenzen eingesetzt werden, in Abhängigkeit von der Natur der Wirtszelle. Starke und gleichzeitig gut regulierte Promotoren sind besonders brauchbar. Sequenzen für den Translationsstart sind z. B. Shine-Dalgarno-Sequenzen, Sequenzen, die für den Start und Stop der Transkription und für die Stabilisierung der mRNA notwendig sind, stehen normalerweise in den nichtkodierenden 5'-Bereichen bzw. 3'-Bereichen viraler oder eukaryotischer cDNAs zur Verfügung, z. B. aus dem Expressionswirt. Verstärker sind transkriptionsstimulierende DNA-Sequenzen viraler Herkunft, z. B. abgeleitet vom Affenvirus, Polyomavirus, Rinderpapillomvirus oder Mononeyschen Sarkomvirus, oder sie sind genomischen Ursprungs.

Signalsequenzen können zum Beispiel eine Präsequenz oder eine sekretorische Leader-Sequenz sein, welche die Sekretion des Polypeptids, Spleißsignale o. ä. lenkt.

Die verschiedenen DNA-Segmente der Vektor-DNA sind operativ miteinander verbunden, d. h. sie grenzen aneinander und stehen in einem funktionellen Zusammenhang miteinander.

Beispiele von Vektoren, die sich für die Replikation und Expression in einem E. coli-Stamm eignen, sind Bakteriophagen, z. B. Abkömmlinge von Lambda-Bakteriophagen, oder Plasmide wie z. B. insbesondere das Plasmid ColE1 und seine Abkömmlinge, etwa pMB9, pSF2124, pBR317 oder pBR322 und von pBR322 abgeleitete Plasmide, etwa pUC9, pUCK0, pHRI148 und pLc24. Geeignete Vektoren enthalten ein vollständiges Replikon, ein Marker-Gen, Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, so daß die Fremd-DNA und ggf. die Expressionskontrollsequenz an diesen Stellen eingefügt werden können, und wahlweise Signalsequenzen und Verstärker.

Mikrobielle Promotoren sind beispielsweise der Links-Promotor P_L des Bakteriophagen Lambda, der durch einen temperaturempfindlichen Repressor kontrolliert wird. Ebenfalls geeignet sind E. coli-Promotoren wie der lac (Lactose) – Promotor, der durch den lac-Repressor reguliert und durch Isopropyl- β -D-thiogalactosid induziert wird, der trp (Tryptophan) – Promotor, der durch den trp-Repressor reguliert und z. B. durch Tryptophan-Aushungerung induziert wird, und der tac (Hybrid-trp-lac) – Promotor, der durch den lac-Repressor reguliert wird. Bevorzugt sind Vektoren, die den P_L -Promotor des Bakteriophagen Lambda enthalten.

Vektoren, die für die Replikation und Expression in Hefen geeignet sind, enthalten einen Hefe-Replikationsstart und ein selektives Markierungsgen für Hefe. Eine Gruppe derartiger Vektoren umfaßt sogenannte ars-Sequenzen (autonome Replikationssequenzen) als Replikationsstartpunkt. Diese Vektoren werden nach der Transformation innerhalb der Hefezelle extrachromosomal zurückgehalten und autonom repliziert. Ferner können Vektoren verwendet werden, welche die 2 μ -(2-Mikron-) Plasmid-DNA aus Saccharomyces cerevisiae ganz oder teilweise enthalten. Solche Vektoren werden durch Rekombination in μ -Plasmide eingebaut, die in der Zelle schon vorhanden sind, oder replizieren sich autonom. 2 μ -Sequenzen sind besonders geeignet, wenn eine hohe Transformationshäufigkeit und hohe Kopienzahlen erzielt werden sollen.

Für die Expression in Hefe geeignete Expressionskontrollsequenzen sind beispielsweise die Kontrollsequenzen von stark exprimierten Hefegenen. So können die Promotoren für das TRP1-Gen, das ADHI- oder ADHII-Gen, das Gen für saure Phosphatase (PHO3- oder PHO5-Gen), das Isozytochrom-Gen, oder ein mit dem glycolytischen Weg verbundener Promotor, wie

z. B. der Promotor der Enolase-, Glyceraldehyd-3-phosphatkinase (PGK)-, Hexokinase-, Pyruvatdecarboxylase-, Phosphofructokinase-, Triosephosphatisomerase-, Phosphoglucoseisomerase- und Glucokinase-Gene verwendet werden. Für die Replikation und Expression in Säugetierzellen geeignete Vektoren werden vorzugsweise mit Promotorsequenzen gebildet, die aus DNA viraler Herkunft abgeleitet sind, z. B. aus dem Affenvirus 40 (SV40), dem Rousschen Sarkomvirus (RSV), dem Adenovirus 2, dem Rinderpapillomvirus (BPV), der BK-Mutante des Papovavirus (BKV), oder dem Maus- oder Human-Zytomegalovirus (CMV). Ersatzweise können die Vektoren Promotoren aus Säugetier-Expressionsprodukten enthalten, wie z. B. Aktin, Kollagen, Myosin usw., oder die nativen Promotor- und Kontrollsequenzen, die normalerweise mit der gewünschten Gensequenz verbunden sind. Beispielsweise kann das Plasmid die Verstärkereinheit des primär-frühen Hauptgens des Maus- oder Human-Zytomegalovirus, die SV40-Verstärkereinheit in Kombination mit dem humanen α -Globin-Promotor und/oder zusätzlich induzierbare Promotoren enthalten, wie z. B. die aus den Hitzeschock- oder Metallothionein-Genen abgeleiteten Promotoren. Bevorzugt werden Vektoren, die den Maus-Zytomegalovirus-Promotor enthalten.

Bevorzugte erfindungsgemäße Hybridvektoren sind Hybridvektoren, die aus dem Plasmid pUCK0 oder aus dem Plasmid pPmu-bio abgeleitet sind. Ebenfalls bevorzugt sind die Vektoren mit den Bezeichnungen pMRP 160, pMRP 160_{ss} und pMRP 70_{ss}. Weiterhin betrifft die Erfindung transformierte Wirtszellen, welche die erfindungsgemäßen Polypeptide und Derivate exprimieren, insbesondere Wirtszellen, die mit einem erfindungsgemäßen Hybridvektor transformiert sind. Solche Wirtszellen sind genetisch stabil und können aus tiefgekühlten Kulturen durch Auftauen und erneutes Klonieren aktiviert werden. Beispiele geeigneter Wirte sind Mikroorganismen, die frei von oder arm an Restriktionsenzymen oder Modifikationsenzymen sind, wie z. B. Bakterien, insbesondere Stämme von *Escherichia coli*, z. B. *E. coli* X 1776, *E. coli* Y 1090, *E. coli* HB 101, *E. coli* W 3110, *E. coli* HB 101/LM 1035, *E. coli* JA 221, *E. coli* DH5 α oder *E. coli* K 12, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Streptococcus* und andere, sowie Hefen, zum Beispiel *Saccharomyces cerevisiae* wie etwa *S. cerevisiae* GRF 18. Weitere geeignete Wirtszellen sind Zellen höherer Organismen, insbesondere bestehende kontinuierliche menschliche oder tierische Zelllinien, z. B. menschliche embryonale Lungenfibroblasten L 132, Bowes-Zellen von menschlichen malignen Melanomen, HeLa-Zellen, mit dem SV40-Virus transformierte Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze (COS-7) oder Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO).

Die oben erwähnten Stämme von *E. coli*, insbesondere *E. coli* K 12 und Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO) werden als Wirtszellen bevorzugt.

Die Erfindung betrifft außerdem Verfahren zur Herstellung transformierter Wirtszellen, wobei eine geeignete Wirtszelle, wie sie weiter oben beschrieben wurde, mit einem erfindungsgemäßen Hybridvektor transformiert wird und die transformierten Zellen selektiert werden.

Die Transformation von Mikroorganismen wird ausgeführt, wie in der Literatur beschrieben, beispielsweise für *S. cerevisiae* (A. Hinnen u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929, 1978), für *B. subtilis* (Anagnostopoulos u. a., J. Bacteriol. 81, 741, 1961) und für *E. coli* (M. Mandel u. a., J. Mol. Biol. 53, 159, 1970).

Dementsprechend umfaßt das Transformationsverfahren für *E. coli* beispielsweise die Ca^{2+} -Vorbehandlung der Zellen, um die DNA-Aufnahme zu ermöglichen, und die Inkubation mit dem Hybridvektor. Die nachfolgende Selektion der transformierten Zellen kann zum Beispiel durch Übertragen der Zellen auf ein selektives Wachstumsmedium erreicht werden, das die Trennung der transformierten Zellen von den Elternzellen in Abhängigkeit von der Natur der Markierungssequenz der Vektor-DNA gestattet. Vorzugsweise wird ein Wachstumsmedium verwendet, das kein Wachstum von Zellen erlaubt, die den Vektor nicht enthalten. Die Transformation von Hefe umfaßt beispielsweise Schritte zur enzymatischen Entfernung der Hefezellwand mit Hilfe von Glucosidasen, die Behandlung der erhaltenen Sphäroplasten mit dem Vektor in Gegenwart von Polyethylenglycol und Ca^{2+} -Ionen und die Regeneration der Zellwand durch Einbettung der Sphäroplasten in Agar. Vorzugsweise wird der Regenerationsagar so hergestellt, daß er die oben beschriebene Regeneration und Selektion der transformierten Zellen gleichzeitig zuläßt.

Die Transformation von Zellen höheren eukaryotischen Ursprungs, wie z. B. von Säugetierzelllinien, wird vorzugsweise durch Transfektion erreicht. Die Transfektion wird nach herkömmlichen Techniken ausgeführt, wie z. B. durch Phosphatäusfällung; Mikroinjektion, Protoplastenfusion, Elektroporation, d. h. Einführung der DNA durch einen kurzen elektrischen Impuls, der vorübergehend die Permeabilität der Zellmembran erhöht, oder in Gegenwart von Helferverbindungen wie Diethylaminoethyl-dextran, Dimethylsulfoxid, Glycerol oder Polyethylenglycol und dergleichen. Nach dem Transfektionsverfahren werden transfizierte Zellen identifiziert und selektiert, z. B. durch Kultivieren in einem selektiven Medium, das in Abhängigkeit von der Natur des Selektionsmarkers ausgewählt wird, z. B. Standardkulturmedien wie das Dulbeccosche modifizierte Eagle-Medium (DMEM), Minimalmedium, RPMI 1640-Medium und dergleichen, die z. B. das entsprechende Antibiotikum enthalten.

Die transformierten Wirtszellen werden nach dem Fachmann bekannten Methoden in einem flüssigen Medium kultiviert, das assimilierbare Kohlenstoffquellen, z. B. Kohlenwasserstoffe wie Glucose oder Lactose, Stickstoffquellen, z. B. Aminosäuren, Peptide, Proteine oder ihre Zersetzungsprodukte wie Peptone, Ammoniumsalze o. ä., und anorganische Salze wie z. B. Sulfate, Phosphate und/oder Carbonate von Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium enthält. Das Medium enthält ferner zum Beispiel wachstumsfördernde Substanzen wie Spurenelemente, etwa Eisen, Zink, Mangan und dergleichen.

Das Medium wird vorzugsweise so gewählt, daß es einen Selektionsdruck ausübt und das Wachstum von Zellen verhindert, die nicht transformiert worden sind oder den Hybridvektor verloren haben. So wird zum Beispiel dem Medium ein Antibiotikum zugesetzt, wenn der Hybridvektor als Marker ein Antibiotikaresistenzgen enthält. Wenn zum Beispiel eine Wirtszelle verwendet wird, die in einer essentiellen Aminosäure auxotroph ist, während der Hybridvektor ein Gen enthält, das ein Enzym kodiert, welches den Wirtsdefekt ergänzt, dann wird zur Kultivierung der transformierten Zellen ein Minimalmedium verwendet, dem die genannte Aminosäure fehlt.

Zellen höheren eukaryotischen Ursprungs wie z. B. Säugetierzellen werden unter Gewebekulturbedingungen unter Verwendung handelsüblicher Medien vermehrt, z. B. mit Dulbeccoschem modifiziertem Eagle-Medium (DMEM), Minimalmedium, RPMI 1640-Medium und dergleichen, wie oben erwähnt, die wahlweise mit wachstumsfördernden Substanzen und/oder Säugetierseren ergänzt werden. Verfahren zur Zellkultivierung unter Gewebekulturbedingungen sind dem Fachmann gut bekannt und umfassen die homogene Suspensionskultur, z. B. in einem Airlift-Reaktor oder in einem Reaktor mit kontinuierlich arbeitendem Rührwerk, oder die Kultur von immobilisierten oder fixierten Zellen, z. B. in Hohlfasern, Mikrokapseln, auf Agarose-Mikroperlen, porösen Glasperlen, Keramikhülsen oder anderen Mikroträgern.

Die Kultivierung erfolgt nach Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind. Die Kulturbedingungen wie Temperatur, pH-Wert des Mediums und Fermentationszeit werden so gewählt, daß ein maximaler Titer des erfindungsgemäßen Polypeptids oder Derivats erzielt wird. So wird ein *E. coli*- oder Hefestamm vorzugsweise unter aeroben Bedingungen im Submersverfahren kultiviert, mit Schütteln oder Rühren bei einer Temperatur von etwa 20°C bis 40°C, vorzugsweise bei etwa 30°C, und einem pH-Wert von 4 bis 8, vorzugsweise von etwa pH 7, über eine Dauer von 4 bis 30 Stunden, vorzugsweise so lange, bis maximale Ausbeuten des erfindungsgemäßen Polypeptids oder Derivats erreicht werden.

Wenn die Zelldichte einen ausreichenden Wert erreicht hat, wird die Kultur unterbrochen und das Polypeptid oder Derivat kann isoliert werden. Wenn der Hybridvektor eine geeignete Sekretionssignalsequenz enthält, wird das Polypeptid oder Derivat von der transformierten Zelle direkt in das Kulturmedium abgesondert. Sonst müssen die Zellen zerstört, beispielsweise durch Behandlung mit einem Detergens wie SDS, NP-40, Triton oder Desoxycholsäure, mit Lysozym oder einem ähnlich wirkenden Enzym lysiert oder mit Ultraschall zertrümmert werden. Bei Verwendung von Hefe als Wirts-Mikroorganismus kann die Zellwand durch enzymatischen Aufschluß mit einer Glucosidase entfernt werden. Ersatzweise oder zusätzlich können zum Aufbrechen der Zellen mechanische Kräfte angewendet werden, wie etwa Scherkräfte (z. B. French-press, Dyno-mill o. a.) oder Schütteln mit Glasperlen oder Aluminiumoxid, oder abwechselndes Einfrieren, z. B. in flüssigem Stickstoff, und Auftauen, z. B. bei 30°C bis 40°C, sowie Ultraschall.

Der Zellenüberstand oder die Lösung, die man nach dem Zentrifugieren der nach dem Aufbrechen der Zellen gewonnenen Mischung erhält und die Proteine, Nukleinsäuren und andere Zellbestandteile enthält, wird in einer an sich bekannten Weise mit Proteinen angereichert, einschließlich der erfindungsgemäßen Polypeptide. So werden zum Beispiel die meisten Nichtprotein-Bestandteile durch Polyethylenimin-Behandlung entfernt und die Proteine einschließlich der erfindungsgemäßen Polypeptide und Derivate werden ausgefällt, beispielsweise durch Sättigung der Lösung mit Ammoniumsulfat oder mit anderen Salzen. Sonst wird der Zellenüberstand bzw. das Lysat unter Anwendung chromatographischer Methoden, wie weiter oben beschrieben, direkt vorgereinigt.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide und ihre Derivate sind nützlich, um zu einem besseren Verständnis der Rolle des mononuklearen Phagozytensystems zu gelangen, das heißt um das lymphokine Signal und die Natur der zellulären Reaktion darauf in Makrophagenpopulationen zu definieren.

Aufgrund ihrer Aktivität als Entzündungsüberträger können die erfindungsgemäßen Polypeptide und ihre Derivate zur Beeinflussung von Entzündungsprozessen eingesetzt werden. Sie sind daher brauchbar für die Therapie chronischer Entzündungszustände.

Außerdem sind die erfindungsgemäßen Polypeptide und ihre Derivate verwendbar für die Untersuchung, Identifikation und Produktion von Antagonisten, die als Medikamente gegen Entzündungen angewendet werden können.

Die Erfindung betrifft außerdem pharmazeutische Präparate, die sich aus einer therapeutisch wirksamen Menge eines erfindungsgemäßen Polypeptids oder Derivats und einem pharmazeutisch akzeptierbaren Träger, z. B. einem anorganischen oder organischen, festen oder flüssigen Träger, zusammensetzen.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparate sind Präparate zur intestinalen, z. B. rektalen oder oralen Applikation und vorzugsweise zur parenteralen, z. B. intranasalen, intramuskulären, subkutanen oder intravenösen Applikation bei warmblütigen Tieren einschließlich des Menschen. Je nach der beabsichtigten Applikationsmethode können die pharmazeutischen Präparate in Form von Dosisseinheiten vorliegen, z. B. in Form von Ampullen, Fläschchen, Zäpfchen, Dragees, Tabletten, Kapseln oder Nasensprays in fester oder flüssiger Form.

Die zu verabreichende Menge der therapeutisch wirksamen Verbindung hängt vom Zustand des Patienten ab, wie z. B. dem Körpergewicht, der Art und Schwere der Krankheit und dem Allgemeinzustand, sowie auch von der Applikationsart, und die Applikation erfolgt entsprechend der Einschätzung des behandelnden Arztes. Die wirksame Dosis eines erfindungsgemäßen Polypeptids oder Derivats liegt in der Größenordnung von 0,001 µg bis 1 µg pro kg Körpergewicht und Tag.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparate enthalten die üblichen anorganischen oder organischen, festen oder flüssigen pharmazeutisch akzeptablen Träger, wahlweise zusammen mit anderen therapeutisch wirksamen Verbindungen und/oder Zusätzen. Es gibt bevorzugt verwendete Lösungen oder Suspensionen des Wirkstoffs, insbesondere isotonische wäßrige Lösungen oder Suspensionen, oder auch lyophilisierte Präparate, die kurz vor Gebrauch in Wasser aufgelöst werden. Die pharmazeutischen Präparate können sterilisiert werden und/oder Konservierungsmittel, Stabilisatoren, Benetzungsmittel, Emulgatoren, Lösungsvermittler, viskositäts erhöhende Substanzen, Salze zur Regulierung des osmotischen Drucks und/oder Puffer sowie auch andere Proteine enthalten, zum Beispiel Humanserumalbumin oder menschliche Blutplasmapräparate.

Bevorzugt werden pharmazeutische Präparate in Form von Liposomen in wäßriger Dispersion, die eine therapeutisch wirksame Menge eines Polypeptids oder Derivats davon enthalten. Es gibt geeignete Liposome, insbesondere solche, die eine möglichst homogene Größenverteilung und einen Durchmesser von ca. $0,2 \times 10^{-6}$ bis $5,0 \times 10^{-6}$ aufweisen und aus einer oder mehreren Schichten von Lipidkomponenten bestehen, z. B. aus amphipatischen Lipiden, etwa Phospholipiden wie Lecithin, Cephalin oder Phosphatidsäure, und wahlweise aus neutralen Lipiden, z. B. Cholesterin, die ein wäßriges Inneres umschließen, das ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder Derivat enthält. Bevorzugt werden Liposome, die aus einer Mischung von synthetischem Phosphatidylserin und Phosphatidylcholin bestehen.

Die Erfindung betrifft ferner polyklonale und monoklonale Antikörper, die für die erfindungsgemäßen Polypeptide oder für Derivate gemäß der Erfindung spezifisch sind, insbesondere Antikörper, die für MRP-160, rMRP-70 oder für Fragmente von MRP-160 spezifisch sind, oder Derivate solcher Antikörper, welche die Spezifität des Antikörpers, aus dem sie abgeleitet sind, bewahren.

Polyklonale Antikörper gemäß der Erfindung stammen aus Säugetieren, z. B. aus Mäusen, Ratten, Kaninchen, Eseln, Ziegen, Schafen, Schweinen, Schimpansen oder vom Menschen, oder sie stammen aus Vögeln, z. B. vom Huhn. Bevorzugt werden Maus-, Ratten-, Kaninchen-, Ziegen-, Schaf- oder Huhn-Antikörper, besonders Kaninchen-Antikörper oder ihre Derivate.

Bevorzugte polyklonale Antikörper sind spezifisch für MRP-160, für rMRP-70 oder für Fragmente von MRP-160, die 12 bis 30 aufeinanderfolgende Aminosäuren von SEQ ID NO: 1 enthalten. Besonders bevorzugt werden polyklonale Antikörper, die spezifisch für MRP-160, rMRP-70 oder für die Fragmente von MRP-160 sind, die den Aminosäuren 1189-1204, 1242-1255, 1409-1427 bzw. 162-177 von SEQ ID NO: 1 entsprechen. Am stärksten bevorzugt werden polyklonale Kaninchen-Antikörper, die für rMRP-70 spezifisch sind.

Bevorzugt werden monoklonale Antikörper, die spezifisch für die erfindungsgemäßen Polypeptide oder für Derivate gemäß der Erfindung sind, insbesondere monoklonale Antikörper, die spezifisch für MRP-160 oder für rMRP-70 oder für Fragmente von MRP-160 sind, oder Derivate solcher Antikörper. Erfindungsgemäße monoklonale Antikörper stammen aus Säugetieren, z. B. aus Mäusen, Ratten, oder vom Menschen, vorzugsweise aber aus Mäusen. Bevorzugt werden monoklonale Maus-Antikörper, die für rMRP-70 spezifisch sind.

Die Spezifität eines Antikörpers gegenüber einem erfindungsgemäßen Polypeptid oder Derivat kann qualitativ in einem Enzym-Immuntest nachgewiesen werden, wobei die Reaktionsvertiefungen (Wells) einer Mikrotiterplatte mit dem Polypeptid ausgestrichen, dann mit dem zu prüfenden Antikörper behandelt werden, und der gebundene Antikörper mit einem markierten Antiserum gegen den Antikörper nachgewiesen wird. Zum Beispiel wird die Spezifität eines erfindungsgemäßen monoklonalen Maus-Antikörpers in einem Enzym-Immuntest vom Sandwichtyp bestimmt, bei dem die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit einem für ein erfindungsgemäßes Polypeptid spezifischen polyklonalen Kaninchen-Antikörper ausgestrichen werden, gefolgt von dem Polypeptid selbst, dann mit dem zu prüfenden Antikörper behandelt werden, und der gebundene monoklonale Antikörper mit markiertem Antiserum gegen den konstanten Teil der Maus-Antikörper nachgewiesen wird.

Derivate eines erfindungsgemäßen Antikörpers bewahren die Spezifität des Antikörpers, von dem sie abgeleitet sind, d. h. sie behalten das charakteristische Bindungsmuster des Eltern-Antikörpers bei. Beispiele für solche Derivate sind Antikörperfragmente, Konjugate der Antikörper mit einem Enzym, ein Fluoreszenzmarker, ein Chemolumineszenzmarker, ein Metallchelate, paramagnetische Teilchen, Avidin, Biotin und dergleichen, oder radioaktiv markierte Antikörper.

Erfindungsgemäße Fragmente sind zum Beispiel die einwertigen Fragmente Fab oder Fab' oder das zweiwertige Fragment F(ab')₂.

Enzyme, die für erfindungsgemäße Antikörperkonjugate verwendet werden, sind zum Beispiel Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase, β -D-Galactosidase, Glucoseoxidase, Glucoamylase, Carboanhydrase, Acetylcholinesterase, Lysozym, Malatdehydrogenase oder Glucose-6-phosphatdehydrogenase.

Zu erfindungsgemäßen Antikörpern konjugierte Fluoreszenzmarker können Fluorescein, Fluoreszenzfarbstoff, Rhodamin und dergleichen sein.

Chemolumineszenzmarker sind z. B. Acridinester von Luminol.

In solchen Konjugaten ist der Antikörper direkt oder über eine Abstands- oder Verbindungsgruppe an den Konjugationspartner gebunden.

Beispiele für Metallchelatebildner sind Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Diethylentriaminpentaessigsäure (DPTA), 1,4,8,11-tetraazatetradecan, 1,4,8,11-tetraazatetradecan-1,4,8,11-tetraessigsäure, 1-oxa-4,7,12,15-tetraazaheptadecan-4,7,12,15-tetraessigsäure oder dergleichen.

Radioaktiv markierte erfindungsgemäße Antikörper enthalten z. B. radioaktives Jod (¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I), Tritium (³H), Kohlenstoff (¹⁴C), Schwefel (³⁵S), Yttrium (⁹⁰Y), Technetium (^{99m}Tc) oder dergleichen.

Erfindungsgemäße polyklonale Antikörper und deren Derivate werden durch an sich bekannte Verfahren gewonnen, zum Beispiel durch ein Verfahren, bei dem ein geeignetes Säugetier oder ein geeigneter Vogel mit einem erfindungsgemäßen Polypeptid oder dessen Derivat, wie z. B. mit MRP-160, rMRP-70 oder Fragmenten von MRP-160 immunisiert wird, wahlweise in Gegenwart eines Adjuvans; das Blutserum des immunisierten Säugetiers oder Eier des immunisierten Vogels werden gesammelt, und wenn erforderlich, werden die Antikörper isoliert und/oder in ihre Derivate umgewandelt.

Geeignete Säugetiere sind diejenigen, die das Antigen, d. h. das erfindungsgemäße Polypeptid oder dessen Derivat, als Fremdmolekül erkennen, z. B. Mäuse, Ratten, Kaninchen, Esel, Ziegen, Schafe, Schweine oder Pferde. Geeignete Vögel sind Hühner.

Die Immunisierungswege sind unter anderem intradermale, subkutane, intramuskuläre, intraperitoneale, intravaskuläre und intrakraniale Injektionen. Da hohe Antikörpertiter erwünscht sind, wird gewöhnlich eine Serie von Injektionen gegeben. Die Immunisierung erfolgt zum Beispiel durch zwei, drei, vier oder mehr parenterale, d. h. intraperitoneale und/oder subkutane Injektionen des Antigens in regelmäßigen oder unregelmäßigen Abständen von einigen Tagen, z. B. von drei bis sieben Tagen, bis zu mehreren Monaten, zum Beispiel vier Wochen.

Das Antigen kann für das Immunisierungsverfahren mit Adjuvantien vermischt werden, d. h. mit Mitteln, welche die Immunreaktion weiter verstärken. Mögliche Adjuvantien sind das vollständige Freund'sche Adjuvans (Emulsion von Mineralöl, Wasser und Mykobakterienextrakten), das unvollständige Freund'sche Adjuvans (Emulsion aus Wasser und Öl allein), Aluminiumhydroxidgels usw.

Bei Immunantwort des Säugetiers wird vorzugsweise durch einen geeigneten Antikörpertest überwacht, z. B. durch einen Enzym-Immuntest, wie er weiter oben beschrieben wurde. Das Blut des Säugetiers wird wenige Tage, z. B. zwei bis fünf Tage nach der letzten Injektion, gesammelt. Ebenso wird die Immunantwort des Vogels durch Untersuchung von Eiern überwacht, die einige Wochen, z. B. vier bis sechs Wochen nach der letzten Injektion gelegt werden. Die Antikörper werden nach bekannten Verfahren isoliert. Sie werden zunächst konzentriert, zum Beispiel durch Ausfällung mit Ammoniumsulfat, Dialyse gegen hygroskopisches Material wie Polyethylenglycol (PEG), Filtration durch selektive Membranen o. ä., und wenn nötig und/oder erwünscht, werden die konzentrierten Antikörper durch übliche chromatographische Methoden gereinigt, z. B. durch Hydroxylapatitchromatographie, Immunoaffinitätschromatographie, Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie oder Chromatographie über DEAE-Zellulose oder Protein A.

Fragmente der Antikörper, z. B. Fab-, Fab'- oder F(ab')₂-Fragmente, können aus den gemäß der obigen Beschreibung hergestellten Antikörpern nach an sich bekannten Methoden gewonnen werden, z. B. durch Aufschluß mit Enzymen wie Papain oder Pepsin und/oder Aufspaltung von Disulfidbindungen durch chemische Reduktion.

Konjugate von erfindungsgemäßen Antikörpern werden nach dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt, z. B. indem ein gemäß der obigen Beschreibung hergestellter Antikörper in Gegenwart eines Kopplungsmittels, z. B. Glutaraldehyd, Perjodat, N,N'-o-phenylendimaleimid, N-(m-maleimidobenzoyloxy)succinimid, N-(3-[2'-pyridyldithio]-propionoxy)-succinimid, N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid oder dergleichen, zur Reaktion gebracht wird. Konjugate mit Biotin werden z. B. hergestellt, indem Antikörper mit einem aktivierten Ester von Biotin, wie z. B. Biotin-N-hydroxysuccinimidester, zur Reaktion gebracht wird. Konjugate mit Fluoreszenz- oder Chemolumineszenzmarkern werden in Gegenwart eines Kopplungsmittels, z. B. der oben aufgeführten, oder durch Reaktion mit einem Isothiocyanat, vorzugsweise mit Fluoresceinisothiocyanat, hergestellt.

Antikörper, die mit radioaktivem Jod markiert sind, erhält man aus den erfindungsgemäßen Antikörpern durch das an sich bekannte Jodieren, zum Beispiel mit radioaktivem Natrium- oder Kaliumjodid und einem chemischen Oxidationsmittel wie z.B. Natriumhypochlorit, Chloramin T o.ä. oder einem enzymatischen Oxidationsmittel wie Lactoperoxidase oder Glucoseoxidase und Glucose. Erfindungsgemäße Antikörper werden beispielsweise durch Diäthylentriaminpentaessigsäure (DPTA)-Chelatbildung mit Yttrium gekoppelt. Mit Technetium-99m markierte Antikörper werden durch Ligandenaustauschprozesse hergestellt, z.B. durch Reduktion von Pertechnat (TcO_4^-) mit Zinn(II)-Ionenlösung, Chelatbildung des reduzierten Technetiums auf einer Sephadex-Säule und Einbringen der Antikörper in diese Säule, oder durch direkte Markierungsverfahren, z.B. durch Inkubation von Pertechnat, einem Reduktionsmittel wie SnCl_2 , einer Pufferlösung wie Natrium-Kaliumphthalat-Lösung und der Antikörper.

Die erfindungsgemäßen Antikörper und deren Derivate erhält man durch an sich bekannte Prozesse, bei denen Zellen einer Hybridomzelllinie, welche die gewünschten monoklonalen Antikörper absondern, in vitro oder in vivo vermehrt werden und, wenn erforderlich, die erhaltenen Antikörper isoliert und/oder in ihre Derivate umgewandelt werden.

Die Vermehrung in vitro erfolgt in geeigneten Kulturmedien, wobei es sich um die gebräuchlichen Standardkulturmedien handelt, zum Beispiel Dulbeccosches modifiziertes Eagle-Medium (DMEM) oder RPMI 1640-Medium, wahlweise ergänzt durch ein Säugetierserum, z.B. fötales Kälberserum, oder Spurenelemente und wachstumsunterstützende Zusätze, z.B. Futterzellen wie normale Peritonealexsudatzellen der Maus, Milzzellen, Knochenmark-Makrophagen, 2-Aminoethanol, Insulin, Transferrin, Lipoprotein geringer Dichte, Oleinsäure oder dergleichen.

Die in-vitro-Produktion liefert relativ reine Antikörperpräparate und gestattet eine Vergrößerung, um große Mengen der gewünschten Antikörper zu erzeugen. Verfahren zur Kultivierung von Säugetierzellen unter Gewebekulturbedingungen sind dem Fachmann bekannt und umfassen die homogene Suspensionskultur, z.B. in einem Airlift-Reaktor oder einem Reaktor mit kontinuierlich arbeitendem Rührwerk, oder die Kultur von immobilisierten oder fixierten Zellen, z.B. in Hohlfasern, Mikrokapseln, auf Agarosemikroperlen oder Keramikhülsen.

Große Mengen der gewünschten monoklonalen Antikörper kann man auch durch Vermehrung der Zellen in vivo erhalten. Zu diesem Zweck werden Hybridomzellen, welche die gewünschten Antikörper produzieren, histokompatiblen Säugetieren injiziert, um das Wachstum von antikörperproduzierenden Tumoren zu bewirken. Wahlweise werden die Tiere vor der Injektion mit einem Kohlenwasserstoff vorbehandelt, insbesondere mit Mineralölen wie Pristan (Tetramethylpentadecan). Nach einer bis drei Wochen werden die Antikörper aus den Körperflüssigkeiten dieser Säugetiere isoliert. Beispielsweise werden aus Balb/c-Mäusen gewonnene Hybridomzellen, welche die gewünschten monoklonalen Antikörper produzieren, Balb/c-Mäusen, die wahlweise mit Pristan vorbehandelt werden, intraperitoneal injiziert und nach einer bis zwei Wochen wird den Tieren Aszitesflüssigkeit entnommen.

Die Isolierung, Reinigung und Derivatisierung der monoklonalen Antikörper wird ausgeführt, wie oben für polyklonale Antikörper beschrieben. Radioaktiv markierte monoklonale Antikörper können auch hergestellt werden, indem den Kulturmedien der in-vitro-Kultivierung radioaktiv markierte Nährstoffe zugesetzt werden. Solche markierten Nährstoffe enthalten z.B. radioaktiven Kohlenstoff.

Die Erfindung betrifft ferner Hybridomzelllinien, welche die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper absondern. Insbesondere betrifft die Erfindung Hybridomzelllinien, die Hybriden von Myelomzellen und B-Lymphozyten eines Säugetiers sind, das mit einem erfindungsgemäßen Polypeptid oder dessen Derivat immunisiert wurde. Vorzugsweise sind diese Zelllinien Hybriden von Maus-Myelomzellen und B-Lymphozyten einer syngenischen Maus, die mit rMRP-70 immunisiert wurde.

Die erfindungsgemäßen Hybridomzelllinien sind genetisch stabil, sondern erfindungsgemäße monoklonale Antikörper mit konstanter Spezifität ab und können in tiefgekühlten Kulturen gehalten und durch Auftauen und wahlweise erneute Klonierung reaktiviert werden.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Gewinnung von Hybridomzelllinien, welche die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper absondern, wobei ein geeignetes Säugetier mit einem erfindungsgemäßen Polypeptid oder dessen Derivat immunisiert wird, antikörper-produzierende Zellen dieses Säugetiers mit Zellen einer kontinuierlichen Zelllinie fusioniert werden, die bei der Fusion erhaltenen Hybridzellen kloniert und Zellklone, welche die gewünschten monoklonalen Antikörper absondern, selektiert werden.

Die Immunisierung wird ausgeführt, wie weiter oben für die Herstellung polyklonaler Antikörper beschrieben wurde.

Antikörperproduzierende Zellen der immunisierten Säugetiere, vorzugsweise Lymphoidzellen wie z.B. Milzlymphozyten, die beispielsweise einen bis fünf Tage nach der letzten Injektion entnommen werden, werden mit den Zellen einer kontinuierlichen Zelllinie fusioniert, d.h. mit einem sich ständig replizierenden Zellklon, der diese Replikationsfähigkeit auf die Hybridzellen überträgt, die aus der Fusion entstehen. Ein Beispiel für eine derartige Zelllinie ist eine Tumorzelllinie (Myelom), die nicht selbst wirklich Immunglobuline oder deren Fragmente produziert, aber die Fähigkeit zur Produktion und Absonderung großer Antikörpermengen besitzt und die ein Markierungsgen trägt, so daß die Hybridzellen von nichtfusionierten Elternzellen durch Selektion getrennt werden können. Mehrere geeignete Myelomzelllinien sind dem Fachmann bekannt. Bevorzugt werden Myelomzelllinien, denen das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) oder das Enzym Thymidinkinase (TK) fehlt und die daher in einem selektiven Kulturmedium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält (HAT-Medium), nicht überleben. Besonders bevorzugt werden Myelomzellen und abgeleitete Zelllinien, die in HAT-Medium nicht überleben und keine Immunglobuline oder deren Fragmente absondern, wie z.B. die Zelllinien P3x63Ag8.653 oder Sp2/0-Ag14.

Die Fusion erfolgt in Gegenwart eines Fusionspromotors, z.B. des Sendai-Virus oder anderer Paramyxoviren, wahlweise in UV-inaktivierter Form, oder chemischer Fusogene, wie z.B. Calciumionen, oberflächenaktiver Lipide, z.B. Lysolecithin, oder Polyethylenglycol (PEG). Vorzugsweise werden die Myelomzellen mit einem drei- bis zwanzigfachen Überschuß von Milzzellen aus immunisierten Säugetieren in einer Lösung fusioniert, die etwa 30% bis etwa 60% Polyethylenglycol mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 4000 enthält.

Nach der Fusion werden die Zellen wiederaufgeschwemmt und in einem selektiven Medium kultiviert, das in Abhängigkeit von dem genetischen Selektionsmarker ausgewählt wird, z.B. in HAT-Medium. In diesem Medium überleben nur Hybridomzellen, da sie die Wachstums- und Replikationsfähigkeit in vitro der Myelom-Elternzellen mit dem Fehlen der für das Überleben im HAT-Medium wesentlichen HGPRT- oder TK-Gene kombinieren, das sie von den antikörperproduzierenden Milzzellen der immunisierten Säugetiere geerbt haben.

Geeignete Kulturmedien für die Vermehrung von Hybridomzellen sind die Standardkulturmedien wie z. B. Dulbecco'sches modifiziertes Eagle-Medium (DMEM), Minimalmedium, RPMI 1640-Medium und dergleichen, wahlweise ergänzt durch ein Säugetierserum, z. B. durch 10 bis 15 % fötales Kälberserum. Vorzugsweise werden zu Beginn des Zellwachstums unmittelbar nach dem Fusionsschritt Futterzellen zugesetzt, z. B. normale Maus-Peritonealexsudatzellen, Milzzellen, Knochenmark-Makrophagen oder dergleichen, um die Hybridzellen zu ernähren und ihr Wachstum, besonders bei niedrigen Zelldichten, durch Bereitstellung von Wachstumsfaktoren o. ä. zu fördern. Wenn phagozytische Zellen wie zum Beispiel Makrophagen oder Monozyten verwendet werden, können sie bei der Beseitigung der Trümmer von toten Myelomzellen, die nach einer Aminopterinbehandlung stets zu finden sind, einen nützlichen Dienst leisten. Die Kulturmedien werden mit selektivem Medium ergänzt, um zu verhindern, daß Myelomzellen die Hybridomzellen überwuchern.

Aus den Überständen der Hybridomzellkultur werden die gewünschten monoklonalen Antikörper ausgelesen, vorzugsweise mit einem Enzymimmunttest oder einem Radioimmunttest. Positive Hybridomzellen werden kloniert, z. B. durch Grenzverdünnung oder in Weichagar, vorzugsweise zweimal oder mehrmals. Wahlweise erfolgt eine Passage der Hybridomzellen durch Tiere, z. B. Mäuse, mittels intraperitonealer Injektion und Sammlung von Aszitesflüssigkeit, wodurch die Hybridomzellen stabilisiert und ihre Wachstumseigenschaften verbessert werden. Die klonierten Zelllinien können in herkömmlicher Weise eingefroren werden. Die erfindungsgemäßen polyklonalen und monoklonalen Antikörper oder ihre Derivate sind brauchbar für die qualitative und quantitative Bestimmung der erfindungsgemäßen Polypeptide bzw. ihrer Derivate. Diese Polypeptide und Derivate sind Marker für Entzündungszustände und gleichzeitig für Hodgkinsche Lymphome.

Zum Beispiel können die Antikörper oder ihre Derivate in jedem bekannten Immuntest eingesetzt werden, der auf der Bindungswechselwirkung zwischen den antigenen Determinanten der erfindungsgemäßen Polypeptide oder ihrer Derivate oder den Markern für Hodgkinsche Lymphome und den Paratopen der Antikörper beruht. Beispiele für solche Tests sind Enzym-, Radio-, Fluoreszenz-, Chemolumineszenz-, Immunpräzipitations-, Latexagglutinations-, Hämagglutinations-Immuntests und Immunfärbung.

Die erfindungsgemäßen Antikörper können als solche oder in Form von enzymkonjugierten Derivaten in einem Enzymimmuntest eingesetzt werden. Es kann jede bekannte Modifikation eines Enzymimmuntests verwendet werden, z. B. der (homogene) Enzymimmuntest in löslicher Phase, der (heterogene) Festphasen-Enzymimmuntest, der Einzel-Enzymimmuntest oder der Doppel-(Sandwich-)Enzymimmuntest mit direkter oder indirekter (kompetitiver) Bestimmung der erfindungsgemäßen Polypeptide bzw. Derivate.

Ein Beispiel für einen solchen Enzymimmuntest ist ein Sandwich-Enzymimmuntest, bei dem ein geeigneter Träger, z. B. die Plastikoberfläche einer Mikrotiterplatte oder eines Prüfröhrchens, z. B. aus Polystyrol, Polypropylen oder Polyvinylchlorid, Glas- oder Kunststoffplatten, Filterpapier, Dextran usw., Zelluloseazetat- oder Nitrozelluloseplatten, magnetische Teilchen oder dergleichen durch einfache Adsorption oder wahlweise nach Aktivierung des Trägers, beispielsweise durch Glutaraldehyd oder Bromcyan, mit einem erfindungsgemäßen polyklonalen oder monoklonalen Antikörper überzogen werden. Es werden die Probelösungen zugesetzt, welche die erfindungsgemäßen Polypeptide oder Derivate oder Marker für Hodgkinsche Lymphome enthalten, und schließlich polyklonale Antikörper, die ebenfalls mit dem Antigen reagieren und enzymmarkiert sind, z. B. mit alkalischer Phosphatase oder Meerrettichperoxidase konjugiert. Die Menge der erfindungsgemäßen Polypeptide oder ihrer Derivate oder der Marker für Hodgkinsche Lymphome in der Testlösung ist direkt proportional zur Menge der gebundenen polyklonalen Antikörper und wird durch Zusetzen einer Enzymsubstratlösung bestimmt. Die Reaktion mit dem Enzymsubstrat führt z. B. zu einer Farbänderung, die visuell oder mit optischen Meßgeräten beobachtet werden kann. Die enzymmarkierten polyklonalen Antikörper können durch erfindungsgemäße enzymmarkierte monoklonale Antikörper ersetzt werden, die ein anderes Epitop des Antigens als die trägergebundenen Antikörper erkennen.

Die erfindungsgemäßen Antikörper können als solche oder in Form von radioaktiv markierten Derivaten in einem Radioimmuntest (RIA) eingesetzt werden. Wie oben für Enzymimmuntests beschrieben, kann jede bekannte Modifikation eines Radioimmuntests angewendet werden.

Die Tests werden analog zu den oben beschriebenen Enzymimmuntests unter Verwendung einer radioaktiven Markierung, z. B. ^{125}I , anstelle einer Enzymmarkierung ausgeführt. Die Menge des gebildeten Immunkomplexes, die der in der Testlösung vorhandenen Menge der erfindungsgemäßen Polypeptide oder Derivate oder Marker für Hodgkinsche Lymphome entspricht, wird durch Messung der Radioaktivität des Immunkomplexes bestimmt.

Die erfindungsgemäßen Antikörper können als solche oder in Form von Derivaten, die mit Chemolumineszenzmarkern konjugiert sind, in einem Chemolumineszenz-Immuntest eingesetzt werden. Die Tests werden analog zu den oben beschriebenen Enzymimmuntests unter Verwendung einer Chemolumineszenzmarkierung anstelle einer Enzymmarkierung ausgeführt. Die Menge des gebildeten Immunkomplexes, die der in den Testlösungen vorhandenen Menge der erfindungsgemäßen Polypeptide oder ihrer Derivate oder der Marker für Hodgkinsche Lymphome entspricht, wird durch Zusetzen einer lumineszenzauslösenden Verbindung, z. B. H_2O_2 und NaOH, und Messung der Lichtemission mit optischen Meßgeräten bestimmt.

Für die Immunfärbung werden Kryoschnitte von kältekonserviertem Biopsiematerial oder in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte mit einer Lösung behandelt, die einen erfindungsgemäßen Antikörper enthält, danach gewaschen und mit einem zweiten Antikörper, der eine Bindung mit dem erfindungsgemäßen Antikörper eingeht, entwickelt; dieser zweite Antikörper kann durch eine radioaktive Markierung, ein mit ihm konjugiertes Enzym, einen Fluoreszenzmarker oder durch Biotin nachgewiesen werden. Sonst wird der Kryoschnitt oder das eingebettete Gewebe mit einer Lösung eines erfindungsgemäßen Antikörper-Derivats in der oben beschriebenen Weise zur Reaktion gebracht, z. B. mit einem mit ^{125}I radioaktiv markierten Derivat, einem Konjugat mit einem Enzym, etwa mit Meerrettichperoxidase, alkalischer Phosphatase oder β -D-Galactosidase, einem Konjugat mit einem Fluoreszenzmarker, etwa mit Fluorescein, oder einem Konjugat mit Biotin. Gebundene radioaktiv markierte Antikörper werden durch Messung der Radioaktivität der Gewebeschnitte nachgewiesen. Gebundene Antikörperkonjugate mit Enzymen werden nach Behandlung mit einem geeigneten Enzymsubstrat nachgewiesen, vorzugsweise mit einem Enzymsubstrat, das am Ort des Antikörpers oder am Ort des zweiten Antikörpers, der eine Bindung mit dem erfindungsgemäßen Antikörper eingeht, zu einer festen Ablagerung (Färbung) führt. Anstelle von Antikörperkonjugaten mit Enzymen können Antikörperkonjugate mit Biotin und eine Lösung von Avidin-Enzym-Konjugat verwendet werden, was zu einer höheren Enzymkonzentration am Ort des Antikörpers und damit zu einer höheren Empfindlichkeit der Immunfärbungsmethode

führt. Die feste Ablagerung des Enzymsubstrats wird durch Betrachtung unter dem Mikroskop oder durch Messung der optischen Dichte bei der Wellenlänge der Färbung nachgewiesen. Die Färbung durch Antikörperkonjugate mit Fluoreszenzmarkern wird ebenso nachgewiesen.

Die erfindungsgemäße Anwendung von Antikörpern und ihren Derivaten entsprechend der obigen Beschreibung zur Bestimmung von erfindungsgemäßen Polypeptiden oder ihren Derivaten oder von Markern für Hodgkinsche Lymphome umfaßt auch andere Immuntests, die an sich bekannt sind, z. B. Immunfluoreszenztests, Latexagglutination mit antikörperbeschichteten oder antigenbeschichteten Latexteilchen, Hämagglutination mit antikörperbeschichteten oder antigenbeschichteten roten Blutkörperchen, Lichtextinktionstests unter Verwendung einer antikörperbeschichteten Lichtleitfaser und weitere direktwirkende Immunsensoren, die das Bindungsereignis in ein elektrisches oder optisches Signal o. ä. umwandeln.

Die Erfindung betrifft außerdem Testsätze zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von erfindungsgemäßen Polypeptiden oder ihren Derivaten oder von Markern für Hodgkinsche Lymphome, die erfindungsgemäße polyklonale und/oder monoklonale Antikörper und/oder deren Derivate und wahlweise andere polyklonale oder monoklonale Antikörper und/oder Zusätze enthalten.

Erfindungsgemäße Testsätze für einen Enzymimmuntest oder Enzymimmunfärbungstest enthalten z. B. einen geeigneten Träger, wahlweise gefriergetrocknete Lösungen eines oder mehrerer polyklonaler und/oder monoklonaler Antikörper, wahlweise gefriergetrocknete oder konzentrierte Lösungen eines enzym- oder biotinkonjugierten Antikörpers, Lösungen eines Enzym-Avidin-Konjugats, falls ein biotinmarkierter Antikörper verwendet wird, Enzymsubstrat in fester oder gelöster Form, Standardlösungen eines erfindungsgemäßen Polypeptids oder eines Derivats davon, Pufferlösungen und wahlweise Polypeptide oder Detergenzien zur Verhinderung unspezifischer Adsorption und Aggregatbildung, Pipetten, Reaktionsgefäße, Eichkurven, Bedienungsanweisungen und dergleichen. Ein oder mehrere Antikörper des Testsatzes sind erfindungsgemäße Antikörper.

Die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperderivate können zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von erfindungsgemäßen Polypeptiden oder ihren Derivaten eingesetzt werden. Aufgrund der Tatsache, daß diese Polypeptide oder Derivate Entzündungsüberträger oder Vorläufer von Entzündungsüberträgern sind, sind die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperderivate somit für die einfache und zuverlässige Diagnose von Entzündungszuständen insbesondere von Spätallergiereaktionen brauchbar. Das Vorhandensein oder die Menge der erfindungsgemäßen Polypeptide oder ihrer Derivate kann in biologischen Flüssigkeiten wie Humanserum, Gelenkflüssigkeit oder Plasma, in Gewebeschnitten und Zellen nach diagnostischen Standardverfahren bestimmt werden, z. B. durch die oben beschriebenen Immuntests, vorzugsweise durch Enzymimmuntests.

Die Bestimmung erfindungsgemäßer Polypeptide und ihrer Derivate kann auch zur Überwachung der Behandlung von Entzündungszuständen während der Therapie angewendet werden, da man durch die Messung der Konzentration der Polypeptide und ihrer Derivate die Effektivität der Therapie einschätzen kann.

Weiterhin sind die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperderivate als Antagonisten zum natürlichen Überträger verwendbar und können daher zur Bekämpfung von Entzündungsprozessen eingesetzt werden. Die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperderivate können zur Isolierung und Reindarstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide oder Derivate aus natürlichen Quellen oder aus transformierten Wirtszellen durch Immunoaffinitätschromatographie eingesetzt werden.

Außerdem können die erfindungsgemäßen Antikörper und Antikörperderivate zur Lokalisierung eines Hodgkinschen Lymphoms bei einem Patienten unter Anwendung von Strahlungsmessverfahren eingesetzt werden. Dazu werden radioaktiv markierte Derivate von Antikörpern, die eine Bindung mit MRP-160, rMRP-70 oder MRP-160-Fragmenten eingehen, dem Patienten injiziert und der Patient wird mit einem Gamma-Abbildungsdetektor in regelmäßigen Zeitabständen abgetastet. Zellen, die Marker für das Hodgkinsche Lymphom exprimieren, nehmen mehr radioaktive Antikörper auf als anderes Gewebe und werden durch die Gamma-Abbildungskamera deutlich erkannt. Für die Strahlungsmessung werden vorzugsweise mit ^{131}I oder mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ markierte monoklonale Antikörper in Mengen von 3 bis 8 µg verwendet, die 15 bis 30 µCi pro kg Körpergewicht entsprechen.

Ferner können die Antikörper selbst und insbesondere ihre Derivate, wie z. B. Konjugate mit zytotoxischen und karzinostatischen Verbindungen zur Behandlung des Hodgkinschen Lymphoms eingesetzt werden. Die therapeutische Dosis für Säugetiere liegt zwischen etwa 10 µg und 1 mg pro kg Körpergewicht für die Antikörper selbst und zwischen 1 µg und 100 µg pro kg Körpergewicht für Konjugate mit zytotoxischen Medikamenten, in Abhängigkeit vom Zustand des Patienten und von der Applikationsart. Die Erfindung betrifft außerdem pharmazeutische Präparate, die Antikörper enthalten, welche eine Bindung mit MRP-160, rMRP-70 oder mit MRP-160-Fragmenten bzw. Derivaten dieser Substanzen eingehen, in therapeutisch wirksamer Menge zusammen mit einem festen oder flüssigen, organischen oder anorganischen pharmazeutischen Träger, zur Behandlung des Hodgkinschen Lymphoms. Geeignete pharmazeutische Präparate sind die oben beschriebenen, die jedoch erfindungsgemäße Antikörper anstelle des Polypeptids oder der Polypeptid-Derivate enthalten.

Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
CIAP	alkalische Kälberdarm-Phosphatase
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat (N = Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin)
DTT	Dithiothreitol
FPLC	schnelle Protein-Flüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
L-Nährbouillon	Luria-Nährbouillon
MAb	monoklonaler Antikörper
NBT	Nitroblau-Tetrazol
OD	optische Dichte
pN6	pNpNpNpNpNpN (N = Desoxynucleotid), zufallsverteiltes 6-meres (Ribo)adenosin-5'-triphosphat
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
U	Einheit(en)

Beispiele

Beispiel 1 Konstruktion der Human-cDNA-Bibliotheken L 132 und MMC

1.1 Isolierung von mRNA aus humanen L 132-Zellen

1.1.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Ein 5-ml-Pellet von 8×10^8 L 132-Zellen (ATTC CCL5, menschliche embryonale Lungenepithelzellen) wird in 20 ml GuSCN-Lösung, die durch ein $0,8 \mu\text{m}$ -Filter passiert wurde und 4 M Guanidinisothiocyanat, 25 mM Natriumacetat, pH 6, sowie 120 mM β -Mercaptoethanol enthält, aufgelöst. Nach kräftigem Schütteln wird die DNA durch zehn aufeinanderfolgende Passagen durch eine 22 G-Nadel teilweise abgeschnitten. Die Lösung wird in Polypropylenröhrchen über drei CsCl-Polster geschichtet, die aus 4 ml einer Lösung von 5,7 M CsCl in 25 mM Natriumacetat mit einem pH-Wert von 6 bestehen, und 16 Stunden lang bei 20°C mit 29000 U/min in einem TST41-Rotor (Kontron) zentrifugiert. Der Überstand wird sorgfältig entfernt und die Pellets werden in 1,5 ml 0,2% SDS wiederaufgelöst und mit 1,5 ml Chloroform extrahiert. Die RNA wird aus der wässrigen Phase durch Zusatz von zwei Volumteilen Ethanol ausgefällt, in 1,5 ml 0,2% SDS wiederaufgelöst und durch Zusatz von Natriumacetat, pH 6, bis zum Erreichen von 0,15 M sowie von zwei Volumteilen Ethanol wiederausgefällt.

1.1.2 Isolierung der mRNA

Das RNA-Pellet, das 14 mg Gesamt-RNA enthält, wird in 5 ml Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA und 0,2% SDS) aufgelöst, 2 Minuten lang auf 65°C erhitzt und schnell auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zusatz von 0,55 ml 5 M NaCl wird die Lösung dreimal einer Säule mit 0,5 g Oligo-dT-Zellulose (Typ 7, Pharmacia) zugeführt, die in Waschpufferlösung (0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA und 0,2% SDS) äquilibriert wurde. Nach dem Waschen der Säule mit 15 ml Waschpufferlösung wird die gebundene RNA in 4 ml Elutionspuffer eluiert. Das eluierte Material wird zwei Minuten lang auf 65°C erhitzt, auf 0,5 M NaCl eingestellt und erneut der wieder äquilibrierten Säule zugeführt (dreimal). Nach dem Waschen mit 15 ml Waschpufferlösung wird die mRNA in 4 ml Elutionspuffer aus der Säule eluiert und nach Zugabe von 0,25 ml 3 M Natriumacetat, pH 6 und 10 ml Ethanol über Nacht bei -20°C ausgefällt. Der Niederschlag (275 μg) wird durch Zentrifugation (15 min bei 16000 g) gesammelt, in 0,4 ml H₂O aufgelöst und durch Zusatz von 25 μl Natriumacetat (3 M, pH 6) und 1 ml Ethanol ausgefällt. Nach zehnminütigem Abschrecken in Trockeneis wird die RNA durch fünfminütige Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge gesammelt. Das Pellet wird an der Luft getrocknet und in 275 μl H₂O wiederaufgelöst.

1.2 Synthese doppelsträngiger cDNA zur Klonierung im Bakteriophagen Lambda gt11

Zunächst wird unter Verwendung der mRNA L 132 aus Beispiel 1.1.2 oder der RNA von einkernigen Leukozyten aus peripherem menschlichem Blut (MNC; hergestellt entsprechend der Beschreibung in der Europäischen PA 0263072) als Matrizen einzelsträngige cDNA synthetisiert. Zwei 10 μg -Proben der L 132 mRNA oder 20 μg MNC-RNA werden eine Stunde lang bei 43°C in jeweils 50 μl Lösung inkubiert, die 100 mM Tris-HCl (pH 8,3; gemessen bei 43°C), 10 mM MgCl₂, 140 mM KCl, 10 mM DTT, 1 mM von jedem dNTP, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Oligo-dT (12–18) (Pharmacia), 90 U RNasin™ (Promega Biotech), 40 U AMV-Umkehrtranskriptase (Genofit) und 5 μCi α -³²P-dCTP (300 Ci/mmol). Nach Vereinigung der beiden entsprechenden Proben werden die RNA-DNA-Hybridmoleküle wie folgt zurückgewonnen: die Probe wird auf eine Molarität von 20 mM in EDTA (pH 7,5) und auf 0,2% in SDS eingestellt, mit einem gleichen Volumen Phenol-Chloroform extrahiert (1:1, äquilibriert mit TNE: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) und in eine 1,5-ml-Säule mit Sepharose-4B (Pharmacia, äquilibriert in TNE mit einem Gehalt von 300 mM NaCl [insgesamt]) eingefüllt. Nach dem Auswaschen der Säule mit der gleichen Pufferlösung werden die Fraktionen, die mindestens 90% des Materials enthalten (beurteilt nach dem eingebauten ³²P) miteinander kombiniert (4–5 $\times$ 50 μl), und zwei Volumteile Ethanol werden zugesetzt. Nach zehnminütigem Abschrecken in Trockeneis wird der Niederschlag durch fünfminütiges Zentrifugieren in einer Eppendorf-Zentrifuge zurückgewonnen, mit 0,1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die RNA-DNA-Hybriden werden nochmals, wie oben beschrieben, eine Stunde lang bei 43°C in einer 50 μl -Reaktion unter Weglassung des Oligo-dT inkubiert. Das Reaktionsgemisch wird dann in EDTA auf 20 mM eingestellt und es werden 3,8 μl 1 N NaOH zugesetzt. Dann wird das Reaktionsgemisch 20 Minuten lang bei 75°C inkubiert, abgekühlt, durch Zusatz von 25 μl 1 M Tris-HCl, pH 8, und 6 μl 1 N HCl neutralisiert und die einzelsträngige cDNA wird zurückgewonnen, wie oben für die RNA-DNA-Hybriden beschrieben.

Zur Synthese des zweiten Strangs werden 5 µg einzelsträngige cDNA 30 Minuten lang bei 37°C in 100 µl Pufferlösung inkubiert, die 33 mM Tris-Acetat, pH 7,9; 66 mM Kaliumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 0,5 mM DTT, 1 mg/ml BSA (Pentax-Fraktion V, Calbiochem), 10 ng/ml pdN6 (Pharmacia), 1 mM von jedem dNTP, 10 µCi α-³²P-dCTP (3000 Ci/mmol) und 500 U/ml T4 DNA-Polymerase (FPLC-rein, Pharmacia) enthält. Die doppelsträngige cDNA wird zurückgewonnen, wie oben für die RNA-DNA-Hybriden beschrieben.

Im nächsten Schritt wird die cDNA mit S1-Nuklease nach dem im folgenden beschriebenen Verfahren aufgeschlossen. 6 µg cDNA werden 5 Minuten lang bei 37°C in 50 µl einer Lösung inkubiert, die 200 mM NaCl, 50 mM Natriumacetat, pH 4,5; 1 mM ZnSO₄ und 0,5% Glycerol enthält. 2,5 U S1-Nuklease (Pharmacia) werden zugesetzt und die Inkubation wird 10 Minuten lang fortgesetzt. Die DNA wird zurückgewonnen, wie weiter oben für die RNA-DNA-Hybriden beschrieben.

Dann wird eine EcoRI-Methylierung wie folgt ausgeführt. 4 µg doppelsträngige cDNA werden 20 Minuten lang bei 37°C in 50 µl Lösung inkubiert, die 100 mM Tris-HCl, pH 8, 5 mM EDTA, 0,4 mg/ml BSA (Pentax-Fraktion V, Calbiochem), 15 µM S-Adenosylmethionin (Biolabs) und 100 U EcoRI-Methylase (Promega Biotech) enthält. Die Reaktion durch eine zehnmündige Inkubation bei 65°C gestoppt. Nach Zusatz von 4 µl 0,5 M EDTA, 100 µl TNE und 1 µl 20%igem SDS wird die Lösung mit Phenol-Chloroform extrahiert und die DNA wird, wie oben beschrieben, durch Ethanoläussfällung zurückgewonnen.

Zur Behandlung mit T4-Polymerase (Boehringer) werden 3 µg cDNA 15 Minuten lang bei 37°C in 50 µl einer Lösung inkubiert, wie sie oben für die Synthese des zweiten Strangs beschrieben wurde, jedoch ohne pdN6, und die DNA wird zurückgewonnen, wie oben für die RNA-DNA-Hybriden beschrieben.

Dann werden synthetische Oligonukleotid-Linker mit T4-Ligase an die stumpfen Enden der DNA-Fragmente ligiert, wie im folgenden beschrieben. 2,5 µg cDNA werden über Nacht bei 15°C in 30 µl Lösung inkubiert, die 20 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM rATP, 3 A₂₆₀ U/ml EcoRI-Linker (pCCGGAATTCCGG, Biolabs) und 800 U T4-Ligase (Biolabs) enthält. Die Reaktion wird durch eine zehnmündige Inkubation bei 65°C gestoppt. Nach Zusatz von 60 µl H₂O werden 10 µl einer Lösung zugesetzt, die 1 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 M MgCl₂, 10 mM DTT und 90 U EcoRI (Boehringer) enthält, und das Reaktionsgemisch wird drei Stunden lang bei 37°C inkubiert. Die cDNA wird zurückgewonnen, wie für RNA-DNA-Hybriden beschrieben, außer daß nach der Äussfällung mit Ethanol die DNA nochmals auf einer zweiten Sepharose 4B-Säule chromatographiert wird.

1.3 Klonierung von cDNA in LAMBDA gt11

Je 25 ng der cDNAs L132 und MNC von Beispiel 1.2 werden über Nacht bei 15°C an 0,5 µg dephosphorylierte, mit EcoRI aufgeschlossene LAMBDA gt11-Arme (Promega Biotech) in 10 µl Lösung ligiert, die 20 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM rATP und 400 U T4-Ligase (Biolabs) enthält.

Die ligierten DNAs werden unter Verwendung von Gigapack Gold™ Verpackungsextrakten (Stratagene) verpackt und zwei Stunden lang bei 20°C inkubiert, wie vom Hersteller beschrieben. 0,5 ml SM-Puffer (Phagenverdünnungspuffer, der aus 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 8 mM MgSO₄, 0,01 % Gelatine besteht) und 20 µl Chloroform werden zugesetzt und die Phagensuspension wird bei 4°C gelagert.

Zur Präparation kompetenter Zellen, die mit Lambda gt11 transformiert werden können, werden 2 ml einer über Nacht angesetzten Kultur von E. coli Y1090 (Promega Biotech) einer Menge von 200 ml TY-Medium (8 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 2,5 g/l NaCl) zugesetzt, das mit 0,2 % Maltose und 50 µg/ml Ampicillin ergänzt wurde, und bei 37°C inkubiert. Wenn die OD₆₀₀ einen Wert von 0,7 erreicht, werden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt und in 50 ml 50 mM MgSO₄ wiederaufgeschwemmt.

10 µl Reihenverdünnungen der oben beschriebenen Phagensuspension werden 100 µl einer Suspension von kompetenten Y1090-Zellen zugesetzt, 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert, einer Menge von 4 ml geschmolzenem Top-Agar (55°C) zugesetzt, der 20 µl einer Lösung von 20 mg/ml IPTG in H₂O und 20 µl einer Lösung von 20 mg/ml Blu-gal™ (BRL) in N,N-Dimethylformamid enthält, und auf TY-Platten ausgestrichen. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wird der Titer für die Phagensuspension, die L132-cDNA enthält, zu 10⁷/ml berechnet; 4 % davon sind Wildtyp-Phagen. Der Titer für die Phagensuspension, welche die einkernige Leukozyten-cDNA enthält, wird zu 2 × 10⁶ berechnet, wovon 30 % zum Wildtyp gehören.

Beispiel 2 Auslese von cDNA, die das Molekül kodiert, das mit dem monoklonalen Antikörper 1C5 reagiert, aus Lambda-gt11-Maus- und -Human-cDNA-Expressionsbibliotheken

Eine cDNA-Bibliothek von linolsäureinduzierten Maus-Peritonealmakrophagen (ML 1005B) und eine cDNA-Bibliothek von nichtinduzierten humanen U937-Zellen (HL 1029B), die beide Lambda-gt11-Expressionsbibliotheken sind und von der Firma Genofit erworben wurden, werden unter Anwendung einer Immunoperoxidasetechnik gesichtet. Die Sichtung erfolgt, um die cDNA zu identifizieren, die das Molekül kodiert, das eine Bindung mit dem monoklonalen Antikörper 1C5 (MAb 1C5) eingeht. Dieser monoklonale Antikörper wird in der Europäischen PA 0162812 beschrieben. Er wird von der Maus-Hybridomzelllinie mit der Bezeichnung 1C5 (CNCM-Hinterlegungsnummer I-316) produziert und ist spezifisch für einen humanen Makrophagenmigrationshemmfaktor (MIF).

Die cDNA-Bibliotheken werden auf einen Titer von 2 × 10⁸ Phagen pro ml eingestellt, im Verhältnis 1:1000 mit SM-Puffer verdünnt, und für jede Bibliothek werden zehn aliquote Teile (20 µl) 20 Minuten lang bei Raumtemperatur mit zehn aliquoten Teilen (1 ml) einer Suspension kompetenter Y1090-Zellen aus Beispiel 1.3 inkubiert. 10 ml geschmolzener TY-Top-Agar (60°C) werden jeder Probe zugesetzt, die auf 15 cm TY-Agarplatten ausgestrichen wird. Nach 10 Minuten werden die Platten 3,5 Stunden lang bei 42°C inkubiert.

Bei Raumtemperatur wird eine 0,45 µm-Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell) auf jede Platte aufgesetzt, die man sich anfeuchten läßt und dreimal mit einem Flüssigkeitsfilm von 1,35 g/l IPTG in H₂O einsprüht. Nach 10 Minuten werden die Platten 3,5 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Nach Positionsmarkierung werden die Filter in TBST-Pufferlösung (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8, und 0,05 % Tween® 20) gespült, anschließend 30 Minuten lang bei Raumtemperatur in der gleichen Pufferlösung, die mit 1 % entfettetem Milchpulver ergänzt wird, langsam hin- und herbewegt, und nochmals in TBST-Pufferlösung gespült.

Die 2 × 10-Filter werden über Nacht bei Raumtemperatur langsam in 2 × 200 ml TBST-Pufferlösung hin- und herbewegt, die mit 1% entfettetem Milchpulver und 20 mg/ml Mab 1C5 ergänzt wurde. Die Filter wurden dreimal 15 Minuten lang mit TBST gewaschen und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 2 × 200 ml alkalischer Phosphatase konjugiertem Ziegen-Anti-Maus-IgG (Dianova) inkubiert, das im Verhältnis 1:2500 mit TBST, ergänzt mit 1% entfettetem Milchpulver, verdünnt ist. Die Filter werden dreimal 15 Minuten lang mit TBST gewaschen.

Die Filter werden durch Zusatz eines Farbreagens entwickelt, das die folgende Zusammensetzung hat: 100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,5% einer Lösung von 75 mg/ml NBT (Biorad) in 70%igem Dimethylformamid und 0,33% einer Lösung von 50 mg/ml BCIP (Biorad) in 100%igem Dimethylformamid. Pro Filter werden 10 ml Farbreagens zugesetzt, und man läßt die Reaktion bei Raumtemperatur ablaufen, bis deutliche Signale aufgetreten sind (bis zu 4 Stunden), wonach die Reaktion gestoppt wird, indem die Filter in eine Lösung gebracht werden, die 20 mM Tris-HCl, pH 8, und 5 mM EDTA enthält. Positive Plaques werden gesammelt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur in 1 ml SM-Pufferlösung geschüttelt, die 20 µl Chloroform enthält. Reihenverdünnungen in SM werden, wie oben beschrieben, ausgestrichen und mit Mab 1C5 ausgelosen. Der Prozeß wird solange wiederholt, bis alle Plaques positiv reagieren. Aus jeder cDNA-Bibliothek werden zwei positive Plaques isoliert: M9 und M10 aus der Maus-Bibliothek ML 1005 B, und H31 sowie H35 aus der Human-Bibliothek HL 1029 B.

Beispiel 3 Isolierung von cDNA-Einschüben der rekombinanten Phagen-DNA M9, M10, H31 und H35

3.1 Isolierung der rekombinanten Phagen-DNA

100 µl der Phagensuspensionen von Beispiel 2 und eine Suspension kompetenter Y 1090-Zellen von Beispiel 1.3 werden vermischt, 20 Minuten lang bei Raumtemperatur stehengelassen und einer Menge von 100 ml TY-Medium zugesetzt, das mit 10 mM MgSO₄ ergänzt ist. Nachdem die Mischung über Nacht in einem 1-l-Kolben bei 37°C mit 250 U/min geschüttelt wurde, werden 1 ml Chloroform und 100 µg RNase A zugesetzt. Nach 30 min bei Raumtemperatur wird NaCl zugesetzt, so daß eine Molarität von 1 M erreicht wird, und nach 1 h auf Eis wird die Lösung durch Zentrifugieren (20 min bei 2000 U/min in einem H6000 Sorvall-Rotor) geklärt. Dem Überstand wird Polyethylenglykol 6000 zugesetzt, so daß sich eine Endkonzentration von 10 ergibt, die Mischung wird 1 h lang auf Eis stehengelassen und der Phage wird durch Zentrifugieren (20 min bei 3000 U/min in einem H6000 Sorvall-Rotor) pelletiert. Das Phagenpellet wird in 2 ml SM-Pufferlösung, die mit 100 µg RNase A und 50 µg DNase I ergänzt ist, wiederaufgeschwemmt. Nach 30 min bei Raumtemperatur wird die Lösung mit 4 ml Chloroform extrahiert und anschließend zentrifugiert (5 min bei 1500 g). Die wäßrige Phase wird auf 10 mM EDTA, 0,1% SDS und 200 µg Pronase eingestellt, bei Raumtemperatur 15 Minuten lang stehengelassen und mit 4 ml Chloroform extrahiert und anschließend zentrifugiert (5 min bei 1500 g). Die wäßrige Phase wird auf 0,5 M NaClO₄ und 33% 2-Propanol eingestellt. Nach 1 h auf Eis wird die DNA durch Zentrifugation (10 min bei 10000 g) zurückgewonnen. Die DNA wird in 200 µl TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) aufgelöst und durch Zusatz von 200 µl 5 M Ammoniumacetat und 0,8 ml 2-Propanol, gefolgt von einer Zentrifugation (10 min bei 10000 g) wiederausgefällt. Nach Waschen mit 70%igem Ethanol wird die DNA in 200 µl TE aufgelöst.

3.2 Isolierung von cDNA-Einschüben

10 µg Phagen-DNA werden 1 h lang bei 37°C in 100 µl Lösung aufgeschlossen, die 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT und 50 U EcoRI enthält. Die cDNA-Einschübe werden durch präparative Agarosegelelektrophorese mit anschließender Elektroelution isoliert. Die Größen der rekombinanten Phagen-DNA-Einschübe M9, M10, H31 und H35 von Beispiel 2 ergeben sich alle mit 2,3 kb.

3.3 Subklonierung der isolierten cDNA-Einschübe

Die EcoRI cDNA-Einschübe werden in den Vektor pBLUKSP™ (Strategene) subkloniert, wobei bestehende Verfahren angewendet werden (T. Maniatis u. a., „Molecular cloning, a laboratory manual“ [Molekulare Klonierung, ein Laborhandbuch], Cold Spring Harbor Laboratory, 1982).

Beispiel 4 Identifikation der gewünschten cDNA-Sequenzen in den Human-Lambda-gt 11-cDNA-Bibliotheken L 132 und MNC durch Kreuzhybridisierung

Die cDNA, die das Molekül kodiert, das mit dem Mab 1C5 reagiert, wird in den menschlichen Lambda-gt 11-cDNA-Bibliotheken L 132 und MNC von Beispiel 1.3 durch sukzessive Auslese unter Verwendung von Mab 1C5, der cDNA-Einschübe von Beispiel 3.2 und ihrer Teilfragmente identifiziert.

Je 5 × 10⁵ Plaques aus den cDNA-Bibliotheken L 132 und MNC (konstruiert entsprechend der Beschreibung in Beispiel 1.3), den handelsüblichen cDNA-Bibliotheken ML 1005 B und HL 1029 B (Beispiel 2) und der nichtinduzierten, aus menschlichen Leukämiezellen abgeleiteten HL 60-Bibliothek HL 1020 B (Genofit) werden auf zehn 15-cm-Platten ausgestrichen, wie oben in Beispiel 1.3 beschrieben, jedoch unter Weglassung von IPTG und Blu-gal™. Aus jeder Platte werden nach feststehenden Verfahren (T. Maniatis u. a., „Molecular cloning, a laboratory manual“ [Molekulare Klonierung, ein Laborhandbuch], Cold Spring Harbor Laboratory, 1982) zwei Replika-Filter hergestellt (NEF-978 A, NEN). Mit den in Tabelle 1 weiter unten aufgeführten radioaktiv markierten Sonden werden mehrere Hybridisierungen ausgeführt, wie im folgenden beschrieben.

Das Hybridisierungsverfahren wird wie folgt ausgeführt. Die Filter werden zwei Stunden lang bei 55°C in einer Lösung (10 ml/Filter) vorhybridisiert, die 2× Denhardtsche Lösung, 6× SSC (physiologische Kochsalzlösung-Natriumcitrat-Puffer, siehe T. Maniatis u. a., ebenda), 0,2% SDS und 50 µg/ml denaturierte Kalbsthymus DNA enthält. Die Hybridisierung wird über Nacht bei 65°C in der gleichen Lösung durchgeführt, welche die hitzedenaturierte oligo-markierte cDNA-Sonde (3–6 × 10⁶ dpm pro Filter) gemäß der untenstehenden Tabelle 1 enthält. Die Oligo-Markierung der entsprechenden cDNA-Fragmente wird wie folgt durchgeführt: 0,1 µg DNA in 13 µl werden 5 Minuten lang auf 95°C gebracht, abgekühlt und kurz zentrifugiert. Nach Zugabe von 2 µl 10× NT-Puffer (0,5 M Tris-HCl, pH 7,2, 0,1 M MgSO₄, 1 mM DTT und 0,5 mg/ml BSA [Pentax-Fraktion V, Calbiochem]), 1 µl einer Lösung, die jeweils 20 mM dGTP, dTTP und dATP, 3 µl α-³²P-dCTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol), 1 µl pdN6 (1 mg/ml, Pharmacia) und 1 µl DNA-Polymerase I (5 U/µl, Boehringer) enthält, wird die Mischung 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die markierte DNA (5 × 10⁸ dpm/µg) wird zurückgewonnen, wie in Beispiel 1.2 für RNA-DNA-Hybriden beschrieben. Nach der Hybridisierung werden die Filter 15 Minuten lang bei 65°C in den folgenden, zweimal gewechselten Lösungen gewaschen: 2× SSC, 0,2% SDS; 1× SSC, 0,2% SDS und 0,5× SSC, 0,2% SDS. Positive Plaques werden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Die bei den Hybridisierungsexperimenten in den einzelnen Bibliotheken identifizierten cDNA-Subfragmente sind in der folgenden Tabelle 1 aufgeführt. Von jedem Sonden-cDNA-Fragment sind der Name des Klon sowie der relative näherungsweise Ort der Sequenz von MRP-160 angegeben (siehe Beispiel 5.2).

Tabelle 1: cDNA-Klone, die zur Hybridisierung verwendet werden

Zur Identifikation des cDNA-Subfragments verwendete Sonde/Ort	Bezeichnung des in jeder cDNA-Bibliothek identifizierten cDNA-Subfragments				
	ML 1005 B	HL 1020 B	HL 1029 B	L 132	MNC
1 C 5	M 9, M 10		H 31, H 35		
M 10-Einschub	M 10.1	H 25	(H 35)*		
3 500-5 800					
M 10.1 kleines		H 23	H 12		
EcoRI-Fragment					
3 020-3 500					
H 23 HindIII-		H 70	H 67, H 69		
EcoRI-Fragment					
3 750-4 710					
H 23 PstI-EcoRI-		H 4, H 5			
Fragment					
2 735-3 275					
H 4 EcoRI-KpnI-				L 4, L 7	
Fragment					
140-1 170					
pMRP-160 BglII-					N 2, N 3
Fragment					
1-1 160					
pMRP-160 BglII-					N 1, N 10
Fragment					
3 670-4 720					

* Reiner Phage ausgestrichen.

Beispiel 5 Isolierung und Bestimmung von Nukleotidsequenzen der überlappenden cDNA-Subfragmente

5.1 Plaque-Reinigung

Positive Plaques, die durch Plaque-Hybridisierung gemäß der Beschreibung in Beispiel 4 identifiziert wurden, werden gesammelt, und Reihenverdünnungen werden ausgestrichen, wie weiter oben in den Beispielen 1.3 und 2 beschrieben. Der Reinigungszyklus wird so lange wiederholt, bis alle Plaques positiv sind. Es wird Phagen-DNA präpariert und die cDNA-Einschübe (siehe Tabelle 1) werden isoliert und subkloniert, wie weiter oben in Beispiel 3 beschrieben.

5.2 Sequenzbestimmung

Die Restriktionsenzymanalyse der cDNA-Subfragmente wird unter Anwendung von Standardverfahren durchgeführt. Passende Restriktionsfragmente aus den cDNA-Subfragmenten sind in den Vektoren pBLUSCRIPT™ bzw. pUCKO kloniert (K. Odink u. a., Nature 330, 80, 1987).

Die cDNA-Sequenzbestimmung wird nach der Dideoxy-Nukleotid-Kettenabbruchreaktionsmethode unter Verwendung von doppelsträngiger DNA und des Sequenase™-Satzes und -Protokolls durchgeführt (United States Biochemical; M. Haltiner u. a., Nucl. Acids Res. 13, 1015, 1985). Universelle Starter werden von Stratagene bezogen. Für den internen Start und Sequenznachweis werden die in Tabelle 2 aufgeführten Starter synthetisiert (Y. Ito u. a., Nucl. Acid Research 11 477, 1983). Die Sequenz wird in beiden Richtungen bestimmt, und wenn in der Sequenzstrategie Restriktionsstellen verwendet werden, werden sie unter Verwendung der überlappenden Fragmente und internen Starter von Tabelle 2 bestätigt.

Tabelle 2: Zur Sequenzierung verwendete Oligonukleotid-Starter

1. H0263 s	ACTCCATCATCTGAGAC
2. H0310r	ACTCGAAAGTCATCCAC
3. H0600 r	ATGCTGGCCGTAGAAGT
4. H0621 s	CCTTCAAACATCCCTCA
5. B0793 s	TGGTGGCACTAAGGCTG
6. B0865 r	CACGCCACCACTCCC
7. H0883 s	GAAGAATGATGGCGCTG
8. H0900 r	CAGCGCCATCATTCTTC
9. B1190 s	TCCAGGAGGCCCTGAAG
10. H1450 r	AGGTCCTCAACCTTCCT
11. H1601 s	GGTGGCTACAGTTTCAG
12. H1650 r	GGTCTTTCTCCAGTTCC
13. B1782 r	GCTTCTAGCTTTTCTTG
14. B1855 s	GAAGGAGATAAAGGCTC
15. H2053 s	GAGACGGCAGAATTGTC

16. H2379 s	ACATCACAGCTCAAGGC
17. H2513 r	TTTAATCTGTTTCTCAG
18. H2610 s	AGTGAAAGAGACTITGG
19. H2884 s	ATGTCAGGAGATAACTC
20. H3111 s	GAAATTGTCGGACCTGG
21. H3157 s	GCCAGGTATGAGAGAGC
22. H3476 s	ATGTGGAAGAGCTGAAC
23. H3492 r	GTTCAGCTCTTCCACAT
24. B3605 r	ACTTCTGAGCTGCTGCC
25. H3731 s	CCAAGTTCATAAAAGAC
26. H4111 r	CCACCTTCATCTTGAGG
27. H4200 s	CAGTCCAAGAAGAAACC
28. H4250 r	TCTGTGTCGTGGAGATC
29. H4400 s	CCTCCAGTGGAGAACTG
30. pUCKO r	CAGTGAGCGAGGAAGCG

Die Zahl gibt den ungefähren Ort auf der Sequenz von MRP-160 an (siehe SEQ ID NO:1). Ein H bedeutet, daß das Oligonukleotid auf der Humanssequenz vorausgesagt wird, ein B bedeutet, daß das Oligonukleotid sowohl auf der Human- als auch auf der Maus-Sequenz startet. Einige Oligonukleotide passen nicht vollständig in die MRP-160-Sequenz. Nummer 30 ist ein universeller Starter für pUCKO.

Die cDNA von 6kb Länge kodiert ein Vorläuferprotein von ca. 160 kD ($1\text{D} = 1\text{ Dalton} = 1,660 \times 10^{-27}\text{ kg}$) mit der Bezeichnung MRP-160. Die vollständige Sequenz der cDNA MRP-160 und die vorausgesagte Aminosäuresequenz sind in SEQ ID NO: 1 dargestellt. Es erweist sich, daß eine Sequenz von 105 Nukleotiden, die wahrscheinlich ein Exon repräsentiert, in den Klonen H5 und N2 fehlt. Die Positionen der cDNA-Subfragmente von Beispiel 4 auf der MRP-160-Sequenz sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Positionen der überlappenden cDNA-Subfragmente

cDNA-Subfragment	Position auf MRP-160
H4	140–3330
H5	1280–3680
H23	2740–4720
H70	3580–5830
L4	1–*
L5	1–*
L7	400–3640
N3	1–2000**
N2	7–3050
N10	2229–5822
N1	4065–5852

* abweichende 3'-Enden; vollständige Sequenz nicht bekannt

** exaktes 3'-Ende nicht bekannt

Beispiel 6 Konstruktion von pMRP160

Ein Hybridvektor, der die MRP-160 kodierende DNA enthält, wird wie folgt konstruiert.

5 µg des Vektors pUCKO werden mit EcoRI aufgeschlossen, mit CIAP dephosphoryliert und durch Agaroseelektrophorese und Elektroelution gereinigt (Fragment a). 5 µg des cDNA-Subfragments H23 werden mit EcoRI und PstI aufgeschlossen. Das 1,4-kb-Fragment, welches das C-Ende von MRP-160 kodiert, wird durch Agarosegelelektrophorese und Elektroelution gereinigt (Fragment b). 5 µg des cDNA-Subfragments L7 werden mit PstI und KpnI aufgeschlossen. Das 2,1-kb-Fragment, das den Mittelteil von MRP-160 kodiert, wird durch Agarosegelelektrophorese und Elektroelution gereinigt (Fragment c). 5 µg des cDNA-Subfragments L4 werden mit EcoRI und KpnI aufgeschlossen, und das 1,2-kb-Fragment, das den N-terminalen Teil von MRP-160 kodiert, wird durch Agarosegelelektrophorese und Elektroelution gereinigt (Fragment d).

0,1 µg der Fragmente a und c und 0,05 µg der Fragmente b und d werden ligiert und in kompetente DH5α-Zellen (Gibco) transformiert. Die rekombinante DNA wird isoliert und durch Restriktionsanalyse analysiert. Ein Plasmid, das ein 4,7-kb-EcoRI-Fragment sowie 1,2- und 3,5-kb-EcoRI-KpnI-Fragmente und 0,5- und 2,7-kb-PstI-EcoRI-Fragmente liefert, wird mit pMRP160 bezeichnet.

Die Sequenz des MRP-160-kodierenden Bereichs wird durch Sequenzanalyse unter Verwendung von Oligonukleotid-Startern gemäß der obigen Beschreibung bestätigt.

Beispiel 7 Konstruktion von pMRP70_H

Ein Hybridvektor, der den kodierenden Teil der DNA des H23-Subfragments enthält, wird wie folgt konstruiert.

Subklone des H23-cDNA-Einschubs in pBLUKSPTM werden durch Restriktionsanalyse analysiert. Ein Klon, der ein 1,2-kb-XhoI-Fragment liefert, wird mit pH23 bezeichnet.

10 µg von pH23 werden mit HincII aufgeschlossen und mit Klenow-Polymerase repariert. Das 1,8-kb-Fragment, das den kodierenden Teil von H23 sowie 33 Nukleotide eines Linkers enthält, wird durch Agarosegelelektrophorese und Elektroelution isoliert (Fragment a). 10 µg des Vektors p_μmu-bio (bezogen von Biogen, abgeleitet aus p_μmuSMCori [G. Buell u. a., Nucl. Acids Research 13, 1923, 1985] durch Austausch des NcoI-HindIII-Fragments durch den pUC9-Polylinker) werden mit NcoI aufgeschlossen. Die klebrigen Enden werden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und die DNA wird mit CIAP dephosphoryliert. Der 3-kb-Vektor wird durch Agarosegelelektrophorese und Elektroelution isoliert (Fragment b).

0,1 µg der Fragmente a und b werden ligiert und in den kompetenten lysogenen E. coli-Stamm K 12 Lambda transformiert. Die rekombinanten Plasmide werden isoliert und durch Restriktionsaufschluß analysiert. Ein Plasmid, das ein BamHI-XhoI-Fragment von 0,8 kb liefert, wird mit pMRP70_{PL} bezeichnet. Die korrekte Konstruktion von pMRP70_{PL} wird durch Sequenzanalyse bestätigt. pMRP70_{PL} wird in kompetente LC137-Zellen zurücktransformiert (SC936; G. Buell, ebenda, und S. Goff u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6647, 1984), die das Plasmid pCI857 enthalten, das ein temperaturempfindliches Cl-Gen trägt (E. Remaut u. a., Gene 22, 103, 1983). Die Transformanten werden nach Kanamycin- plus Ampicillinresistenz selektiert. Zellen, die pMRP70_{PL} enthalten, werden als Glycerolkultur bei –70°C gespeichert.

Beispiel 8 Fermentation von rMRP-70

Das pMRP70_{PL} kodierte Peptid rMRP-70 wird in E. coli exprimiert, wie im folgenden beschrieben.

Zellen, die pMRP70_{PL} enthalten, werden aus einer Glycerolkultur auf eine Kanamycin/Ampicillin-Platte ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Aus einer Einzelkolonie wird im Verlauf von 6 Stunden bei 30°C eine 12-ml-Kultur in LBMKA gezogen (L-Nährbouillon, die 50 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml Kanamycin enthält) (Kultur a). Zehn 200-ml-LBMKA in 2-l-Kolben werden mit 1 ml Kultur a beimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Die Kulturen werden mit 800 ml LBM bei 30°C verdünnt und weitere drei Stunden lang zur Vermehrung stehengelassen (Kulturen b). Die Synthese von rMRP-70 wird durch schnelles Erhitzen der Kulturen b auf 42°C in einem Wasserbad von 50°C induziert und anschließend zwei Stunden lang bei 42°C geschüttelt (Kulturen c). Die Zellen aus den Kulturen c werden durch Zentrifugation gesammelt.

Beispiel 9 Reinigung und Charakterisierung von rMRP-70

9.1 Zellextraktion

E. coli-Zellen, die rMRP-70 exprimieren und aus 10 Liter Fermentationsbrühe von Beispiel 8 bis auf eine optische Dichte von 1,2 OD-Einheiten/ml vermehrt wurden, werden mit 250 ml 8 M Guanidinhydrochlorid, 50 mM Tris-HCl, 30 mM NaCl, pH 8,0, die 6 ml 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PSMF) in 2-Propanol enthalten, aufgespalten. Die Suspension wird 60 Minuten lang mit 20000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in Dithiothreitol (DTT) auf 0,1 % eingestellt und bei 4°C gegen 10 mM Tris-HCl, 0,01 % DTT, pH 8,0; dialysiert (Spectrapor-Membran Nr. 3; 3,5 kD Abscheidegrenzwert; Spectrum Medical Industries). Der entstehende weiße Niederschlag wird durch Zentrifugation von 30 Minuten mit 20000 g bei 4°C entfernt.

9.2 DEAE-Ionenaustauschchromatographie

Der Überstand von Beispiel 9.1 wird in eine DEAE-Trisacryl M (LKB)-Ionenaustauschsäule (5 × 10 cm) gepumpt, die mit dem Dialysepuffer äquilibriert ist. Nach dem Laden der Probe wird die Säule mit Dialysepuffer gewaschen, bis die UV 254-nm-Absorption auf Grundlinienniveau abfällt. Die an die Säule gebundenen Proteine werden unter Anwendung eines linearen NaCl-Gradienten von 0,0 M bis 0,2 M NaCl im Dialysepuffer (600 ml) eluiert, gefolgt von Dialysepuffer/0,2 M NaCl (200 ml) und Dialysepuffer/0,1 M NaCl (200 ml) mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 4 ml/min. Einzelne 12-ml-Fractionen werden gesammelt und mittels SDS-PAGE (U. K. Laemmli, Nature 227, 680, 1970) auf 15%-Polyacrylamid-Plattengelen analysiert (Färbung mit Coomassieblau) und entsprechend ihrem rMRP-70-Gehalt gepoolt. Fractionen von 0,12 bis 0,2 M NaCl werden gepoolt, gegen Dialysepuffer dialysiert und nochmals unter Anwendung des gleichen Verfahrens chromatographiert, mit Ausnahme der Säulenabmessungen (2,6 × 10 cm), der Puffer volumina (50 %) und der Durchflußgeschwindigkeit (2 ml/min). Fractionen von 0,16 bis 0,2 M NaCl werden gepoolt und durch Ultrafiltration in einer Zelle mit Rührwerk (YM-10-Membran, Amicon) um den Faktor 10 konzentriert.

9.3 Ausschlußchromatographie

2 ml des konzentrierten Pools nach der Ultrafiltration von Beispiel 9.2 (Proteinkonzentration 14 mg/ml) werden auf einer Ultropac TSK-G 2000 SWG (LKB) – Säule (21,5 × 600 mm) in 20 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,0; bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 3 ml/min separiert. Die UV-Absorption wird bei 280 nm beobachtet und einzelne 6-ml-Fractionen werden mittels SDS-PAGE analysiert, wie in Beispiel 9.2 beschrieben. Fractionen, die 32 bis 38 Minuten nach der Injektion der Probe entnommen werden, werden gepoolt und durch Ultrafiltration in einer Zelle mit Rührwerk (YM-10-Membran, Amicon) um den Faktor 7 konzentriert.

9.4 Ionenaustauschchromatographie auf FPLC-Mono Q™

4 ml des konzentrierten Pools nach der Ultrafiltration von Beispiel 9.3 (Proteinkonzentration 4,9 mg/ml) werden in eine Mono Q™ HR 10/10-Säule (10 mm × 100 mm) (Pharmacia) geladen, die in 20 mM Diethanolamin/HCl, pH 8,5; (Startpuffer) äquilibriert wurde. Die Säule wird mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 4 ml/min 10 Minuten lang mit Startpuffer gespült. Die Proteine werden dann 20 Minuten lang unter Anwendung eines linearen Gradienten eluiert, der mit Startpuffer/0,1 M NaCl endet. Die Extinktion des Eluats wird bei 280 nm beobachtet. rMRP-70 wird in der Zeit zwischen 21 und 23 Minuten nach Injektion der Probe eluiert (ca. 0,55 bis 0,65 M NaCl).

9.5 Umkehrphasen-HPCL

Als Alternative zu der in Beispiel 9.3 beschriebenen Ausschluß-HPLC oder zu der in Beispiel 9.4 beschriebenen FPLC an Mono Q wird der konzentrierte Pool nach der Ultrafiltration von Beispiel 9.2 mit 1/10 des Volumens 10%iger Trifluoressigsäure (TFA) angesäuert und auf einer Vydac 214TP510 HPLC-Säule (10 × 250 mm) (The Separation Group, Hesperia, CA, USA) gereinigt. Die Säule wird in einer Mischung aus 70 % TFA, 0,1 % in Wasser und 30 % TFA 0,08 % in Acetonitril äquilibriert und das Produkt wird 24 Minuten lang mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 1 ml/min durch einen linearen Gradienten eluiert, der mit einer Mischung von 50 % TFA 0,1 % in Wasser und 50 % TFA 0,08 % in Acetonitril endet. Die Extinktion des Eluats wird bei 220 nm beobachtet und die einzelnen Peaks werden entsprechend der UV-Extinktion manuell aufgenommen. Man erhält zwei Hauptpeaks bei 15 min bzw. 16,5 min, die analysiert werden, wie im folgenden Beispiel 9.6 beschrieben.

9.6 Analyse durch SDS-PAGE

Aliquote Teile der Fractionen aus der Umkehrphasen-Säule von Beispiel 9.5 werden unter Vakuum getrocknet, in Dissoziationspuffer aufgelöst, 2 Minuten lang auf 96°C erhitzt und auf ein 15%iges Polyacrylamidgel aufgebracht (Färbung mit

Coomassieblau R-250). Der 15-min-Peak von Beispiel 9.5 enthält mehrere verkürzte Versionen von rMRP-70 mit angenäherten scheinbaren Molekulargewichten von 55kD, 44kD, 38kD bzw. 33kD ($1\text{D} = 1\text{Dalton} = 1,6601 \times 10^{-27}\text{kg}$). Das Material des 16,5-min-Peaks besteht aus reinem rMRP-70, das in einer Einzelbande mit einem Molekulargewicht von ca. 70kD wandert.

9.7 Aminosäuresequenzanalyse

Das gereinigte rMRP-70 von Beispiel 9.6 wird einer Sequenzanalyse der N-terminalen Aminosäuren unterworfen, wobei ein Gasphasen-Sequenzanalysator (Modell 470, Applied Biosystems) nach der Methode von M. W. Hunkapillar und L. E. Hood (Methods in Enzymol. 91, 399, 1983) eingesetzt wird. Die Anilinothiazolinon-Derivate werden durch Behandlung mit 25%iger wäßriger TFA bei 50°C zu Phenylthiohydantoin (PTH)-Aminosäuren umgelagert. Die PTH-Aminosäuren werden auf einer Zorbax™ CN HPLC-Säule (DuPont; 200 x 4,6mm) nach R. Knecht u. a. (Anal. Biochem. 130, 65, 1983) analysiert. Es wird die folgende N-terminale Aminosäuresequenz gefunden: Met-Asp-Gly-Ile-Asp-Lys-Leu-Asp-Ile-Glu-Phe-Gly-Asn-Met-Leu-Ser. Die Aminosäuresequenz entspricht genau der Sequenz, die aus der in Beispiel 5.2 beschriebenen Konstruktion vorausgesagt wurde.

9.8 Immunfluoreszenzanalyse

Monozyten in Teflonbeuteln werden nach dreitägiger Kultur in Mc Coyschem Medium (Biochrom, Berlin, BRD), das mit 20% Humanserum ergänzt ist, durch zehnmündiges Zentrifugieren bei 150g geerntet, in PBS gewaschen und 30 Minuten lang bei 4°C in 1% BSA, 1 µg/ml Maus-IgG in 1 ml PBS/1 x 10⁷ Zellen inkubiert. Die Zellen werden zweimal in PBS gewaschen und in aliquote Teile zu 1 x 10⁶ Zellen pro Testpunkt in 1,6-ml-Eppendorf-Fläschchen aufgeteilt. Die Inkubation in geeigneter Verdünnung von rMRP-70 oder natürlichem Human-MIF (Europäische PA 0162812) (100 µl/1 x 10⁶ Zellen in PBS) wird zehn Minuten lang bei 4°C ausgeführt. Die Zellen werden zweimal in PBS gewaschen und 45 Minuten lang entweder mit biotinyliertem monoklonalem Antikörper 1C5 (Maus, siehe EP 0162812) oder Anti-rMRP-70-Serum (Kaninchen) inkubiert. Als Kontrollen werden biotinyliertes Maus-IgG bzw. Kaninchen-Normal-IgG verwendet. Nach zweimaligem Waschen in PBS/0,05% BSA werden die Zellen mit Streptavidin-FITC (Sigma, München, BRD) für die biotinylierten Antikörperbehandelten Sonden und mit Ziege-Anti-Kaninchen-F(ab')₂-FITC (Dianova, Hamburg, BRD) für die mit Kaninchen-Antiserum behandelten Sonden 45 Minuten lang bei 4°C inkubiert. Die Zellen werden zweimal in PBS/0,05% BSA gewaschen. Vor dem letzten Waschen werden die Zellen in 100 µl 1 mM Propidiumjodid in PBS wiederaufgeschwemmt, 5 Minuten lang bei 4°C inkubiert, gewaschen, und in einem EPICS™-Zellsortierer (Coulter Electronics, Hialeah, Fla., USA) analysiert. Rot fluoreszierende Zellen werden elektronisch aus der Messung der grünen Fluoreszenz der Zellen ausgeschlossen. Der prozentuale Anteil grün fluoreszierender positiver Zellen wird mit dem von Coulter Electronics gelieferten Immunprogramm berechnet.

Der relative Anteil der fluoreszierenden Zellen ist ähnlich für rMRP-70 und natürlichem MIF. Dies zeigt, daß sowohl natürlicher MIF als auch rMRP-70 eine Bindung mit kultivierten Monozyten eingehen.

9.9 Migrationshemmtest

Monozyten aus Leukozytenschichten, die einen Tag lang in Dulbeccoschem Medium, ergänzt mit 10% FCS (Biochrom, Berlin, BRD), auf Teflonmembranen kultiviert wurden, werden durch zehnmündiges Zentrifugieren bei 150g geerntet, zweimal in Dulbeccoschem Medium ohne FCS gewaschen und in aliquote Teile von 2 x 10⁶ Zellen/Testpunkt in 1,5-ml-Eppendorf-Fläschchen aufgeteilt. Die Zellen werden wiederaufgeschwemmt und zehn Minuten lang bei 4°C mit 200 µl PBS mit oder ohne eine geeignete Verdünnung von rMRP-70 oder natürlichem MIF (EP 0162812) inkubiert. Die Zellen werden fünf Minuten lang bei 150g zentrifugiert, gewaschen, in 200 µl PBS wiederaufgeschwemmt und 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS werden die pelletierten Zellen in 4 µl Dulbeccoschem Medium, das 0,2% niedrigschmelzende Agarose (Miles, Frankfurt, BRD) enthält, bei 37°C wiederaufgeschwemmt. Ein µl der Zellsuspension wird in eine der inneren 60 Vertiefungen einer Platte mit 96 Reaktionsvertiefungen pipettiert. Jede Probe wird doppelt getestet. Die Platte wird 10 Minuten lang bei 4°C gehalten. Die Reaktionsvertiefungen werden mit 100 µl/Vertiefung Dulbeccoschem Medium, 10% FCS gefüllt und 16-24 Stunden lang bei 37°C in feuchter Luft mit einem CO₂-Gehalt von 7% inkubiert. Nach der Inkubation wird die Wanderung der Monozyten aus den Agarosetröpfchen heraus mit Hilfe eines Strichgitters mit Skalenteilung im Okular eines Mikroskops gemessen. Die Migration der Zellen in der Kontrolllösung wird gleich 100% Migration oder gleich 0% Migrationshemmung gesetzt. Die Migrationsentfernung wird in % Migrationshemmung ausgedrückt. Eine Substanz wird als biologisch aktiv betrachtet, wenn sie eine Migrationshemmung von mehr als 30% bewirkt. Die Ergebnisse des Migrationshemmungstests mit rMRP-70 sind in der untenstehenden Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Migrationshemmung kultivierter Monozyten durch rMRP-70

Konzentration von rMRP-70 µg/ml	Migrationshemmung
0,001	15%
0,01	24%
0,1	50%
1	57%
10	43%

Beispiel 10: Konstruktion des Expressionsvektors pCDEX

10 µg pSV0d-DNA (P. Mellon u. a., Cell 27, 279, 1981) werden mit HindIII aufgeschlossen. Die klebrigen Enden werden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt, und nach der Hitzeinaktivierung der Polymerase wird die DNA mit NaeI aufgeschlossen. Das 2,2-kb-Vektorfragment, das den SV40-Replikationsstartpunkt trägt, wird durch Agarosegelelektrophorese und Elektroelution isoliert (Fragment a). 10 µg pCGA28-DNA (Europäische PA 0305967) werden mit BamHI aufgeschlossen. Die klebrigen Enden werden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und die DNA wird mit Kalbsdarm-Phosphatase dephosphoryliert. Das 3,9-kb-Fragment, das den Maus-Zytomegalovirus (MCMV)-Promotor/Verstärker, die tPA-cDNA und einen β-Globin-Spleißdonor-/akzeptor- und polyadditionsort trägt, wird durch Agarosegelelektrophorese und Elektroelution isoliert (Fragment b). Etwa 50 ng der Fragmente a und b werden ligiert und in kompetente DH5α-Zellen transformiert. Die rekombinanten Plasmide werden isoliert

und durch Aufschluß mit PvuI und HindIII analysiert. Ein Plasmid, das ein 1,4-kb- und ein 4,8-kb-Fragment liefert, wird mit pCON10 bezeichnet. 5 µg von pCON10 werden mit XmaI aufgeschlossen und mit CIAP dephosphoryliert (Fragment d). Die DNA wird durch Agarosegelelektrophorese und Elektroelution gereinigt.

1 µg eines Adapters (Biolabs # 1101) mit der Sequenz 5'-GATCCCCGGG-3' wird mit T4-Polynukleotidkinase behandelt und mit T4-Ligase ligiert. Nach der Hitzeinaktivierung der Ligase wird die DNA mit XmaI aufgeschlossen. Nach Extraktion mit Phenol/Chloroform wird die DNA mit Ethanol ausgefällt (Adapter e).

50 ng des DNA-Fragments d werden mit 50 ng des Adapters e ligiert und in kompetente DH5α-Zellen transfiziert. Die rekombinante DNA wird isoliert und durch Aufschluß mit BamHI und HindIII analysiert. Ein Plasmid, das Fragmente von 1,7 kb und 4,4 kb liefert, wird mit pCDEX bezeichnet.

Beispiel 11: Konstruktion von pMRP160_{ss}

5 µg pMRP160 werden mit EcoRI aufgeschlossen und die klebrigen Enden werden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt: Das 4,7-kb-Fragment, das MRP-160 kodiert, wird durch Agarosegelelektrophorese und Elektroelution isoliert (Fragment a). 5 µg pCDEX werden mit HindIII und BamHI aufgeschlossen. Die klebrigen Enden werden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und die DNA wird mit CIAP dephosphoryliert. Das 4,5-kb-Vektorfragment wird durch Agarosegelelektrophorese und Elektroelution isoliert (Fragment b). 0,1 µg der Fragmente a und b werden ligiert und in kompetente DH5α-Zellen transformiert. Die rekombinante DNA wird isoliert und durch Restriktionsanalyse analysiert. Ein Plasmid, das ein KpnI-Fragment von 0,6 kb sowie ein XhoI-Fragment von 4,1 kb liefert, wird mit pMRP160_{ss} bezeichnet.

Die Sequenz des MRP-160-kodierenden Bereichs wird durch Sequenzanalyse unter Verwendung von Oligonukleotid-Startern bestätigt, wie weiter oben beschrieben.

Beispiel 12: Expression von pMRP160_{ss} in Ovarzellen des chinesischen Hamsters

12.1 Transfektion von CHO-Zellen mit pMRP160_{ss} und Selektion der transfizierten Klone

Das Plasmid pMRP160_{ss} wird in Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) der Linie CUXB1 exprimiert, einer Mutante, der das Enzym Dihydrofolatreduktase fehlt (G. Urlaub u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216, 1980). Die Zellen werden in α-MEM (Minimalmedium) kultiviert, das Nukleoside und 5% fötales Kälberserum enthält (sämtlich von Gibco). Die Zellen werden mit einer Dichte von 10⁴/cm² in Mikrotiterplatten mit jeweils 6 Vertiefungen (3,4 cm² Durchmesser; Nunc) ausgestrichen und mit 4 µg DNA des Plasmids pSV2-neo (P. Southern und P. Berg 1, 327, 1982) nach Standardverfahren kotransfiziert, wie ausführlich im US-Patent 4399216, von R. J. Kaufman und P. A. Sharp (J. Mol. Biol. 159, 601, 1982) und von Asselbergs u. a. (J. Mol. Biol. 189, 401, 1986) beschrieben. In einem zweiten Experiment werden 0,4 µg DNA des Plasmids pND2 (DHFR) mit 0,4 µg DNA von pMRP160_{ss} und 0,4 µg von pSV2-neo kotransfiziert (Asselbergs u. a., obenda).

48 Stunden später werden die transfizierten Zellen trypsiniert und auf drei Petrischalen (8,0 cm² Durchmesser, Nunc) übertragen. Am nächsten Tag wird das nichtselektive Medium durch ein selektives Medium ersetzt (α-MEM ohne Nukleoside, das 5% (v/v) dialysiertes fötales Kälberserum und 1,0 mg/ml Genetecin [Gibco] enthält).

Nach zwei Wochen werden 18 genetizinresistente Klone isoliert und in einem Einzelzelltest unter Verwendung der affinitätschromatographisch gereinigten Kaninchen-anti-rMRP-70-Antikörper von Beispiel 14.2 nach feststehenden Protokollen (Suter u. a., Cancer Immunol. Immunother. 16, 53, 1983) auf die Expression von MRP-160 untersucht. Vier Klone zeigen mit dem Anti-rMRP-70-IgG eine selektive Färbung. Sie werden mit 1B8, 2A2, 2B1 und 2B3 bezeichnet. Von diesen Klonen sind 2A2, 2B1 und 2B3 mit dem Plasmid pND2 kotransfiziert worden.

Durch Immun-Blotting (H. Towbin u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350, 1979) mit Zellysaten dieser Transfektanten zeigt sich, daß unter reduzierenden Bedingungen (U. K. Laemmli, Nature 227, 680, 1970) die Kaninchen-anti-rMRP-70-Antikörper mit Spezies mit Molekulargewichten von 120 und 140 kD reagieren.

12.2 Selektion von Klonen, die amplifizierte MRP-160-Sequenzen mit Methotrexat exprimieren

Eine subkonfluente Kultur des CHO-Klons 2B1 wird mit 20 nM Methotrexat (MTX, Sigma) 24 Stunden lang vorbehandelt und dann 1:20 in Petrischalen von 8 cm Durchmesser (Nunc) verteilt. Die Zellen werden in dem selektiven Medium α-MEM ohne Nukleoside, das mit 5% dialysiertem fötalem Kälberserum und 0,05 mg/ml Gentamycin (sämtlich von Gibco) (R. Kaufman und P. A. Sharp, obenda) ergänzt ist, vermehrt. Die Selektion wird nach 24 Stunden begonnen, indem der Petrischale 20 nM MTX zugesetzt werden. Nach 14 Tagen werden die resistenten Kolonien in Pools gesammelt und durch Grenzverdünnung in Platten mit 96 Reaktionsvertiefungen (Falcon) in Selektionsmedium kloniert, das 50 nM MTX enthält. Von 16 isolierten Klonen erweisen sich drei mit dem Kaninchen-anti-rMRP-70-Antikörpern als stark positiv. Der mit 2B1-B4 bezeichnete Klon wird erneut durch Grenzverdünnung in Selektionsmedium kloniert, das 100 nM MTX enthält. Es werden 8 resistente Klone selektiert, die sämtlich mit Kaninchen-anti-rMRP-70 reagieren. Die mit 2B1-B4C2 und 2B1-B4E3 bezeichneten Klone werden einer schrittweise bis auf 500 nM erhöhten MTX-Konzentration ausgesetzt.

12.3 MRP-160-Konzentrationen in Zellysaten und Kulturüberständen der amplifizierten CHO-Klone

Zur quantitativen Bestimmung von rMRP-70 und MRP-160 in Zellysaten und Kulturüberständen der amplifizierten CHO-Klone 2B1-B4C2 und 2B1-B4E3 wird eine enzymverbundene Immunadsorptionsbestimmung (ELISA) an zwei Stellen durchgeführt.

12.3.1 Präparation der Zellysate und Kulturüberstände

Zur Produktion des Kulturüberstands werden die CHO-Klone 2B1, 2B1-B4C2, 2B1-B4E3 und der scheintransfizierte CHO-Klon 3AB (Beispiel 12.1) bis zur Subkonfluenz vermehrt und 48–72 Stunden lang mit α-MEM inkubiert, das mit 5% dialysiertem fötalem Kälberserum ergänzt ist. Den Klonen 2B1-B4C2 und 2B1-B4E3 wurden zusätzlich 200 nM MTX zugesetzt. Nach der Ernte werden die Überstände 15 Minuten lang bei 2000g, danach 15 Minuten bei 12000g zentrifugiert und bei –80°C gelagert.

Die Präparation der Zellysate erfolgt nach Standardprotokollen. Kurz zusammengefaßt, werden die trypsinierten Zellen (2 × 10⁷/ml) 15 Minuten lang auf Eis mit Lysepuffer behandelt (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% SDS [alle von Biorad], 1,0% Nonidet P 40 [Shell], 1,0 mM Phenylmethylsulfonylfluorid [Boehringer Mannheim], pH 7,5; R. J. Kaufman und P. A. Sharp,

ebenda). Nachdem die Zellröhrer 15 Minuten lang mit 2000g abgeschleudert worden sind, wird der Überstand 15 Minuten lang mit 12000g zentrifugiert und bei -80°C gelagert. Die Gesamtproteinkonzentration wird nach der Methode von Lowry u. a. (J. Biol. Chem. 193, 265, 1951) bestimmt.

12.3.2 Zweistellen-ELISA

Aliquote Teile der Zellsate und Kulturüberstände der Scheintransfektante 3AB, der Elterntransfektante 2B1 und der MTX-behandelten Klone 2B1-B4C2 und 2B1-B4E3 werden mit der im folgenden beschriebenen enzymverbundenen Immunadsorptionsbestimmung (ELISA) an zwei Stellen auf ihre Konzentration an rMRP-70 und MRP-160 geprüft. Der ELISA-Test wird unter Verwendung der affinitätschromatographisch gereinigten Kaninchen-anti-rMRP-70-Antikörper von Beispiel 14.2 unter Einhaltung von Standardprotokollen durchgeführt (E. Engvall und P. Perlman, Immunochem. 8, 871, 1971; J. Bruggen u. a., Cancer Immunol. Immunother. 15, 200, 1983). Kaninchen-anti-rMRP-70-IgG (1,0 µg/ml) in 0,05M Carbonatpuffer, pH 9,8; wird mit 100 µl/Reaktionsvertiefung auf Platten mit 96 Vertiefungen (Nunc FI) ausgestrichen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachdem die unspezifischen Stellen mit Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (TBS, 0,05M, pH 7,4), die 0,2% Gelatine (Biorad), 1,0% Rinderserumalbumin (Serva) und 0,05% Tween® 20 (Biorad) enthält, eine Stunde lang bei Raumtemperatur blockiert wurden, werden die Testproben (50 µl), rekombinante rMRP-70-Standards (1,9-250 ng/ml, siehe Beispiel 9) und in Blockierungspuffer verdünnte Kontrollproben zugesetzt und eine Stunde lang bei 37°C gehalten. Die Platten werden 30 Minuten lang bei 37°C mit TBS, das biotinyliertes Anti-rMRP-70-IgG enthält (50 µl, 0,5 µg/ml, Biotinylierung nach einem modifizierten Protokoll von Lerner u. a., J. Exp. Med. 152, 1085, 1980), gewaschen (Skatron Microwash II). Nach dem Waschen werden 30 Minuten lang bei 37°C 50 µl Konjugat aus Streptavidin mit alkalischer Phosphatase (Gibco BRL) zugesetzt. Das gebundene Enzym wird 30 Minuten lang bei Umgebungstemperatur mit 100 µl p-Nitrophenylphosphat (1,0 mg/ml in Diethanolaminpuffer 1M, pH 9,8; Sigma) inkubiert und dann mit 0,5N HCL gestoppt. Die Extinktionswerte werden bei 405 nm abgelesen (Multiscan MCC, Flow). Die Daten werden unter Verwendung eines logistischen 4-Parameter-Kurvenanpassungsprogramms (Flow) aufbereitet. Die Ergebnisse des ELISA-Tests sind in der folgenden Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5: rMRP-70- und MRP-160-Konzentrationen in Zellsaten und Überständen der transfizierten CHO-Zellen^a

Zelllinie	Zellsat ^b (ng MRP-70/mg Protein)	Kulturüberstand ^c (ng MRP-70/ml/10 ⁶ Zellen)
2 B 1 (Elternzelle)	23,0	0,0
2 B 1-B 4 C 2 (MTX-behandelt)	1 250,0	50,0
2 B 1-B 4 E 3 (MTX-behandelt)	892,0	60,0
3 AB (Scheinkontrolle)	0,0	0,0

a) Zweistellen-ELISA; Kaninchen-anti-rMRP-70 gegen biotinyliertes Kaninchen-anti-rMRP-70; die Werte sind in ng/ml angegeben, bezogen auf den rekombinanten rMRP-70-Standard; die Nachweisgrenze ist 1,0 ng/ml.

b) Bezogen auf mg Gesamt-Zellprotein.

c) Überstände werden nach 72 h geerntet, beginnend mit subkonfluenten Zellkulturen.

Die MTX-behandelten Klone exprimieren zellulär ca. 50mal mehr rMRP-70-verwandtes Protein als die Elternzelle 2B1. Die Überstände der MTX-Klone enthalten 50-60 ng/ml/10⁶ Zellen immunreaktives Protein, während die Elternzelle 2B1 negativ ist.

Beispiel 13: Induktion einer Entzündungsreaktion in der Haut von Meerschweinchen

MRP-160 wird in einem Test unter Verwendung normaler Meerschweinchen auf die Fähigkeit zur Induktion von Hautreaktionen geprüft.

Normale Meerschweinchen werden rasiert, anästhesiert und erhalten eine intradermale Injektion von je 100 µl des Überstands verschiedener mit MRP-160 amplifizierter CHO-Zelllinien. Die Hautreaktion wird nach 24 h und nach 48 h bestimmt. Positive Reaktionen führen zu einer signifikanten Rötung in einem Bereich von ca. 5-12 mm Durchmesser. Es zeigt sich, daß mehrere MRP-160-amplifizierte CHO-Zelllinien Hautreaktionen induzieren, während weder die kultivierten und unter identischen Bedingungen injizierten Kontrollzellen noch das Kulturmedium selbst irgendeinen Effekt hervorrufen.

Beispiel 14. Präparation polyklonaler Antikörper

14.1 Präparation von Kaninchen-anti-rMRP-70-Serum

0,5 mg rMRP-70 (hergestellt entsprechend der Beschreibung in den Beispielen 8 und 9) in vollständigem Freundschem Adjuvans (Gibco) werden Kaninchen injiziert, gefolgt von einer Auffrischungsinjektion von 0,5 mg rMRP-70 in unvollständigem Freundschem Adjuvans (Gibco) nach 20 Tagen. Der Titer des Kaninchenserums wird durch eine enzymverbundene Immunadsorptionsbestimmung (ELISA) in Mikrotiterplatten, die mit rMRP-70 ausgestrichen sind, nach feststehenden Protokollen beobachtet (E. Engvall und P. Perlmann, Immunochem. 8, 871, 1971). Die Untersuchung von Western-Blots zeigt, daß nach erschöpfender Adsorption mit Lysaten nichttransfizierter E. coli-Zellen die einzige im Serum verbleibende Aktivität gegen rMRP-70 gerichtet ist.

14.2 Isolierung rMRP-70-spezifischer polyklonaler Kaninchen-Antikörper durch Immunoaffinitätschromatographie

Eine rMRP-70-Affigel-Immunoabsorbenssäule wird präpariert, indem 4–5 mg gereinigter rMRP-70 nach dem vom Hersteller (Bio-Rad) angegebenen Verfahren mit 1 ml Affigel[®] 10 kombiniert werden. Immunglobulin G (IgG) aus dem monospezifischen Kaninchen-anti-rMRP-70-Serum von Beispiel 14.1 wird durch Ammoniumsulfat bei 50 % Sättigung ausgefällt. Der Niederschlag wird in PBS aufgelöst und gegen PBS dialysiert. 15 ml der dialysierten Lösung, die ca. 100 mg IgG enthält, werden mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 10–12 ml/h durch die Immunoaffinitätsäule gepumpt. Unspezifisch gebundenes Material wird durch Waschen der Säule mit PBS/0,4 M Natriumchlorid entfernt. Spezifisch gebundenes IgG wird mit 0,1 M Glycinhydrochlorid, pH 2,5; eluiert. Fraktionen, welche die Antikörper enthalten, werden gepoolt, durch Zusatz von 1 M Tris neutralisiert und gegen PBS dialysiert. Man erhält ca. 4 mg rMRP-70-spezifisches IgG.

14.3 Präparation von Oligopeptiden, die Fragmente von MRP-160 repräsentieren

Unter Anwendung der in H. Rink u. a., *Peptides: Chemistry, Structure and Biology* (Peptide: Chemie, Struktur und Biologie) (Hrsg. J.E. Rivier und G.R. Marshall), ESCOM, Leiden 1990, S. 1041, beschriebenen Methode werden durch schrittweise Festphasensynthese mit 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) – geschützten Aminosäuren als ihren vorgelagerten 1-Hydroxybenzotriazolester in N-methylpyrrolidin die folgenden Oligopeptide synthetisiert.

MRP-160-Fragment 1: Glu-Glu-Glu-Arg-Ser-Val-Leu-Asn-Asn-Gln-Leu-Leu-Glu-Met-Met-Lys-Lys, entsprechend den Aminosäuren 1189–1204 von SEQ ID NO: 1

MRP-160-Fragment 2: Arg-Asn-Glu-Val-Thr-Val-Leu-Arg-Gly-Glu-Asn-Ala-Ser-Ala, entsprechend den Aminosäuren 1242–1255 von SEQ ID NO: 1

MRP-160-Fragment 3: Glu-Ile-Cys-Glu-Met-Phe-Gly-His-Trp-Ala-Tyr-Asn-Cys-Asn-Asp-Asp-Glu-Thr-Phe, entsprechend den Aminosäuren 1409–1427 von SEQ ID NO: 1

MRP-160-Fragment 4: Ser-Thr-Pro-Ser-Asn-Ile-Pro-Gln-Lys-Pro-Ser-Gln-Pro-Ala-Ala-Lys, entsprechend den Aminosäuren 162–177 von SEQ ID NO: 1

14.4 Kaninchen-Antiseren, die gegen die MRP-160-Fragmente 1, 2, 3 und 4 gerichtet sind

Von jedem der vier Oligopeptide von Beispiel 14.3 werden 0,5 mg in vollständigem Freundschem Adjuvans (Gibco) vier verschiedenen Kaninchen injiziert, gefolgt von einer Auffrischungsinjektion in unvollständigem Freundschem Adjuvans (Gibco) nach 20 Tagen. Der Titer der Kaninchenserum wird durch enzymverbundene Immunsorptionsbestimmung (ELISA) in Mikrotiterplatten (Nunc), die mit den jeweiligen Peptiden ausgestrichen sind, wie in Beispiel 14.1 überwacht. Immunglobulin G (IgG) wird aus den Seren mit 50 % Ammoniumsulfat ausgefällt.

Eine Affigel 10 – Immunoabsorbenssäule wird präpariert, indem 4–5 mg des jeweiligen MRP-160-Fragments 1, 2, 3 bzw. 4 nach dem vom Hersteller (Bio-Rad) angegebenen Verfahren mit 1 ml Affigel[®] 10 kombiniert werden. Die vier Niederschläge von IgG werden jeweils in PBS aufgelöst und gegen PBS dialysiert. 15 ml der dialysierten Lösungen IgG-Niederschläge für das jeweilige Anti-MRP-160-Fragment, die ca. 100 mg IgG enthalten, werden mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 10–12 ml/h durch die Immunoaffinitätsäule gepumpt. IgG wird isoliert, wie in Beispiel 14.2 beschrieben. Man erhält ca. 4 mg des für das jeweilige MRP-160-Fragment 1, 2, 3 bzw. 4 spezifischen IgG.

Beispiel 15: Präparation von Hybridomzellen, die monoklonale Antikörper gegen rMRP-70 produzieren

15.1 Immunisierungsprotokoll

Drei weiblichen Balb/c-Mäusen wird jeweils 0,1 mg rMRP-70 in vollständigem Freundschem Adjuvans (Gibco) intraperitoneal injiziert, gefolgt von zwei Auffrischungsinjektionen von 0,05 mg rMRP-70 in unvollständigem Freundschem Adjuvans (Gibco) in Abständen von je 14 Tagen. Nach 6 Wochen werden 0,05 mg rMRP-70 in physiologischer Kochsalzlösung injiziert und die Mäuse werden vier Tage später getötet.

15.2 Zellfusion und Selektion von Hybridomen

Alle Fusionen werden unter Einhaltung der folgenden Protokolle durchgeführt (G. Köhler und C. Milstein, *Nature* 256, 495, 1976), wobei die nichtabsondernde Myelomzelllinie P 2 × 63 Ag 8.653 (ATCC-Nr. CRL 1580) verwendet wird. 10⁶ Milzzellen werden mit 10⁷ Myelomzellen in Gegenwart von 35 % (Gew./Vol.) Polyethylenglycol (PEG 4000, Merck) und 15 % Dimethylsulfoxid (Merck) fusioniert. Das Fusionsgemisch wird in Standard-HAT-Selektionsmedium, das mit 20 % FCS (Gibco) ergänzt ist, auf 1200 Reaktionsvertiefungen von Mikrotiterplatten (Falcon) verteilt, die Maus-Peritonealexsudatzellen als Futterzellen enthalten. Nach 10–14 Tagen werden die Überstände wachsender Hybridome mit einem Sandwich-ELISA-Test (Beispiel 16) auf die Bindung von rMRP-70 geprüft. Positive Hybridome werden mindestens zweimal durch Grenzverdünnung nachkloniert.

15.3 Entwicklung von Hybridomen und Isolierung rMRP-70-spezifischer monoklonaler Antikörper

8–10 Wochen alte Balb/c-Mäuse werden intraperitoneal (i. p.) mit 0,3 ml Pristan (Aldrich) vorbehandelt. 2–3 Wochen später werden 5–10 × 10⁶ klonierte Hybridomzellen und 0,2 ml Prostan i. p. injiziert. Nach 8–10 Tagen wird Aszitesflüssigkeit gesammelt, bei 800 g zentrifugiert und bei –80 °C gelagert.

Als Alternative werden die Hybridome in vitro unter Verwendung von Hybridom-Medium (Gibco) in großem Maßstab vermehrt. Der Überstand wird bei 800 g zentrifugiert, mit einem 0,45-µm-Nalgene[®]-Filter filtriert und bei –80 °C gelagert.

Roh-Immunglobulin wird durch tropfenweise Zugabe von 0,9 Volumäquivalenten gesättigtem Ammoniumsulfat bei 0 °C ausgefällt, dann in 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,9; aufgelöst. Eine IgG-Fraktion wird unter Anwendung des Affigel[®]-Protein A MAPS-Satz-Verfahrens von Bio-Rad gewonnen. Die eluierte IgG-Fraktion wird wieder mit Ammoniumsulfat ausgefällt und in PBS bei einer Konzentration von 10 mg/ml aufgelöst und gegen den gleichen Puffer dialysiert.

Beispiel 16: Enzymimmunttest zum Nachweis von MRP-160, rMRP-70 oder MRP-160-Fragmenten

16.1 Biotinylierung polyklonaler und monoklonaler Antikörper

1 mg polyklonaler Kaninchen-anti-rMRP-70- oder -anti-MRP-160-Fragment 1-, 2-, 3- bzw. 4 – Antikörper von Beispiel 14 oder monoklonaler Anti-rMRP-70-Antikörper von Beispiel 15 und 0,1 mg Biotin-X-NHS[®] (Calbiochem) werden in 1,0 ml 0,1 M Hepes-Puffer, pH 8,0; 4 Stunden lang bei 4°C nach dem vom Hersteller vorgeschlagenen Verfahren zur Reaktion gebracht. Die biotinylierten Antikörper werden bei 4°C gegen PBS dialysiert und bei –80°C gelagert.

16.2 Sandwich-ELISA

MRP-160, rMRP-70 und MRP-160-Fragmente werden durch einen in Beispiel 12.3.2 beschriebenen Zweistellen-Sandwich-ELISA-Test nachgewiesen.

Der Test weist rMRP-70 in transformierten Zellen oder MRP-160 in Zelllysaten humaner Monozyten, in transformierten Zellen und in Körperflüssigkeiten menschlicher Patienten bis zu einer unteren Grenze von 1,0 ng/ml nach.

16.3 Testsatz für Sandwich-ELISA

Ein Testsatz für den Sandwich-ELISA-Test von Beispiel 16.2 enthält beispielsweise:

- Mikrotiterplatten (Nunc FI)
- 20 ml affinitätschromatographisch gereinigte polyklonale Anti-rMRP-70-Kaninchen-Antikörper (1 µg/ml) in 0,05 M Carbonatpuffer, pH 9,8
- 1,0 ml rekombinante rMRP-70-Standardlösung (1 mg/ml) in TBS, das 0,05% Tween 20 enthält
- 10 ml biotinylierte Kaninchen-anti-rMRP-70-Antikörper (0,5 µg/ml) in TBS, pH 7,4, 0,2% Gelatine, 1% BSA, 0,05% Tween 20
- 10 ml Streptavidin/alkalische Phosphatase (BRL) 1:5000 in TBS, pH 7,4, 0,2% Gelatine, 1% BSA, 0,05% Tween 20
- 200 ml TBS, 0,05% Tween 20
- 200 ml TBS, pH 7,4, 0,2% Gelatine, 1% BSA, 0,05% Tween 20
- 20 ml p-Nitrophenylphosphat (1,0 mg/ml) in Diethanolaminpuffer (1 M, pH 9,8)
- Eichkurve
- Bedienungsanleitung.

Beispiel 17: Nachweis des Hodgkinschen Lymphoms durch Immunfärbung

Lymphknotenbiopsien, Hautbiopsien oder andere Gewebebiopsien werden in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan schnellgefroren und bei –75°C gelagert. 5-µm-Gewebeschnitte werden angefertigt, 15 min lang in Aceton fixiert und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Schnitte werden 10 min lang in PBS wieder eingeweicht, dann in einer 1:100-Verdünnung von polyklonalen Kaninchen-anti-rMRP-70-Antikörpern von Beispiel 14.2 30 min lang inkubiert, 10 min lang in PBS gespült, dann in einer 1:400-Verdünnung von monoklonalen Maus-anti-Kaninchen-Antikörpern (Dakopatts, Kopenhagen, Dänemark) 30 min lang inkubiert. Die Schnitte werden 10 min lang in PBS gespült und mit ABCComplex[™] (mit biotinylierter Peroxidase komplexiertes Avidin, Dakopatts) nach den Anweisungen des Herstellers behandelt. Das Reaktionsprodukt wird mit dem chromogenen Substrat AEC/Wasserstoffperoxid (50 mg Aminoethylcarbazol, 33 µl 30%iges H₂O₂, 5 ml Dimethylformamid, 100 ml Acetatpuffer 0,05 M, pH 6,9) entwickelt. Die Schnitte werden 5 min in Acetatpuffer gespült, mit Mayerschem Hämatoxylin gegengefärbt, mit Glyceringelee montiert und unter einem Mikroskop untersucht. Die Ergebnisse, die mit Biopsiematerial aus verschiedenen Quellen gewonnen wurden, sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Die Immunfärbung unter Verwendung von Anti-rMRP-70-Antisera ist deutlich auf die Hodgkinsche Krankheit und die verwandten anaplastischen großen Zellymphome beschränkt.

Tabelle 6: Immunfärbung des Hodgkinschen Lymphoms und anderer Gewebeschnitte

Gewebequelle und Diagnose	Zahl der Fälle	Zahl der Anti-MRP-70-Färbungen
Lymphknoten		
Hodgkinsche Krankheit	36	31
Lymphknoten		
Anaplastische große Zellymphome (Ki-1-positiv)	4	4
Lymphknoten		
andere als Hodgkinsche Lymphome	10	0
Lymphknoten		
unspezifische Lymphadenitis	4	0
Haut		
Entzündungszustände	4	0
Adenokarzinom	2	0
Plattenepithelkarzinom	1	0
Weichteilkarzinom	3	0

Beispiel 18: Pharmazeutisches Präparat für parenterale Applikation

200 µg rMRP-70 oder MRP-160 werden in 3 ml 5 N Humanserumalbumin aufgelöst. Die entstehende Lösung wird durch ein bakteriologisches Filter passiert und die filtrierte Lösung wird unter aseptischen Bedingungen auf 10 Fläschchen verteilt. Die Fläschchen werden vorzugsweise in der Kälte gelagert, zum Beispiel bei -20°C.

Ebenso werden pharmazeutische Präparate hergestellt, die 0,5 mg, 1 mg, 2 mg und 5 mg polyklonale oder monoklonale Antikörper nach den Beispielen 14 und 15 in 3 ml 5 N Humanserumalbumin enthalten. Pharmazeutische Präparate von höherer Konzentration erhält man durch Auflösen von 10 mg monoklonalem Antikörper gegen rMRP-70 (Beispiel 15) in 2 ml sterilisierter physiologischer Kochsalzlösung.

Sequenzliste

SEQ ID NO:1 (Sequenzbezeichner Nr. 1)

SEQUENZTYP: Nukleotid mit entsprechendem Protein

SEQUENZLÄNGE: 5858 Basenpaare/1427 Aminosäuren

URSPRÜNGLICHER QUELLORGANISMUS: Mensch

DIREKTE EXPERIMENTELLE QUELLE: cDNA-Bibliothek in Lambda gt11

EIGENSCHAFTEN: Marker für Entzündung und Hodgkinsches Lymphom

GCGGCGCAGG	CGGCGGCGTC	CGAGGAGATT	TAATCCAGAG	ACTGACTTCA	50
CTATAGAACC	CACAGTTGTA	TCAATGGTTG	GGGAAAGATA	GTGGCAACAG	100
GCAAAGGAGA	AACAGCTCTG	ACATACAAAG	AAA ATG AGT ATG CTA		145
			Met Ser Met Leu		
			1		
AAG CCA AGT GGG CTT AAG GCC CCC ACC AAG ATC CTG AAG CCT					187
Lys Pro Ser Gly Leu Lys Ala Pro Thr Lys Ile Leu Lys Pro					
5 10					
GGA AGC ACA GCT CTG AAG ACA CCT ACG GCT GTT GTA GCT CCA					229
Gly Ser Thr Ala Leu Lys Thr Pro Thr Ala Val Val Ala Pro					
20 25					
GTA GAA AAA ACC ATA TCC AGT GAA AAA GCA TCA AGC ACT CCA					271
Val Glu Lys Thr Ile Ser Ser Glu Lys Ala Ser Ser Thr Pro					
35 40					
TCA TCT GAG ACT CAG GAG GAA TTT GTG GAT GAC TTT CGA GTT					313
Ser Ser Glu Thr Gln Glu Glu Phe Val Asp Asp Phe Arg Val					
50 55					
GGG GAG CGA GTT TGG GTG AAT GGA AAT AAG CCT GGA TTT ATC					355
Gly Glu Arg Val Trp Val Asn Gly Asn Lys Pro Gly Phe Ile					
65 70					
CAG TTT CTT GGA GAA ACC CAG TTT GCA CCA GGC CAG TGG GCT					397
Gln Phe Leu Gly Glu Thr Gln Phe Ala Pro Gly Gln Trp Ala					
75 80					
GGA ATT GTT TTA GAT GAA CCC ATA GGC AAG AAC GAT GGT TCG					439
Gly Ile Val Leu Asp Glu Pro Ile Gly Lys Asn Asp Gly Ser					
90 95					
GTG GCA GGA GTT CGG TAT TTC CAG TGT GAA CCT TTA AAG GGC					481
Val Ala Gly Val Arg Tyr Phe Gln Cys Glu Pro Leu Lys Gly					
105 110					
ATA TTT ACC CGA CCT TCA AAG TTA ACA AGG AAG GTG CAA GCA					523
Ile Phe Thr Arg Pro Ser Lys Leu Thr Arg Lys Val Gln Ala					
120 125					
GAA GAT GAA GCT AAT GGC CTG CAG ACA ACG CCC GCC TCC CGA					565
Glu Asp Glu Ala Asn Gly Leu Gln Thr Thr Pro Ala Ser Arg					
135 140					
GCT ACT TCA CCG CTG TGC ACT TCT ACG GCC AGC ATG GTG TCT					607
Ala Thr Ser Pro Leu Cys Thr Ser Thr Ala Ser Met Val Ser					
145 150 155					
TCC TCC CCC TCC ACC CCT TCA AAC ATC CCT CAG AAA CCA TCA					649
Ser Ser Pro Ser Thr Pro Ser Asn Ile Pro Gln Lys Pro Ser					
160 165 170					

SEQ ID NO:1, Fortsetzung

CAG Gln	CCA Pro	GCA Ala 175	GCA Ala	AAG Lys	GAA Glu	CCT Pro	TCA Ser 180	GCT Ala	ACG Thr	CCT Pro	CCG Pro	ATC Ile 185	AGC Ser	691
AAC Asn	CTT Leu	ACA Thr	AAA Lys 190	ACT Thr	GCC Ala	AGT Ser	GAA Glu 195	TCT Ser	ATC Ile	TCC Ser	AAC Asn	CTT Leu	TCA Ser 200	733
GAG Glu	GCT Ala	GGC Gly	TCA Ser	ATC Ile 205	AAG Lys	AAA Lys	GGA Gly	GAA Glu	AGA Arg 210	GAG Glu	CTC Leu	AAA Lys	ATC Ile	775
GGA Gly 215	GAC Asp	AGA Arg	GTA Val	TTG Leu	GTT Val 220	GGT Gly	GGC Gly	ACT Thr	AAG Lys	GCT Ala 225	GGT Gly	GTA Val	GTC Val	817
CGG Arg	TTT Phe 230	CTT Leu	GGG Gly	GAG Glu	ACC Thr	GAC Asp 235	TTT Phe	GCC Ala	AAG Lys	GGG Gly	GAG Glu 240	TGG Trp	TGT Cys	859
GGC Gly	GTG Val	GAG Glu 245	TTA Leu	GAT Asp	GAG Glu	CCA Pro	CTT Leu 250	GGG Gly	AAG Lys	AAT Asn	GAT Asp	GGC Gly 255	GCT Ala	901
GTT Val	GCT Ala	GGA Gly	ACA Thr 260	AGG Arg	TAT Tyr	TTT Phe	CAG Gln	TGT Cys 265	CAA Gln	CCC Pro	AAA Lys	TAT Tyr	GGC Gly 270	943
TTG Leu	TTC Phe	GCT Ala	CCT Pro	GTC Val 275	CAC His	AAA Lys	GTT Val	ACC Thr	AAG Lys 280	ATT Ile	GGC Gly	TTC Phe	CCT Pro	985
TCC Ser 285	ACT Thr	ACA Thr	CCA Pro	GCC Ala	AAA Lys 290	GCC Ala	AAG Lys	GCC Ala	AAC Asn	GCA Ala 295	GTG Val	AGG Arg	CGA Arg	1027
GTG Val	ATG Met 300	GCG Ala	ACC Thr	ACG Thr	TCC Ser	GCC Ala 305	AGC Ser	CTG Leu	AAG Lys	CGC Arg	AGC Ser 310	CCT Pro	TCT Ser	1069
GCC Ala	TCT Ser	TCC Ser 315	CTC Leu	AGC Ser	TCC Ser	ATG Met	AGC Ser 320	TCA Ala	GTG Ser	GCC Ser	TCC Val	TCT Ser 325	GTG Ser	1111
AGC Ser	AGC Val	AGG Arg	CCC Pro 330	AGT Ser	CGG Arg	ACA Thr	GGA Gly	CTA Leu 335	TTG Leu	ACT Thr	GAA Glu	ACC Thr	TCC Ser 340	1153
TCC Ser	CGT Arg	TAC Tyr	GCC Ala	AGG Arg 345	AAG Lys	ATC Ile	TCC Ser	GGT Gly	ACC Thr 350	ACT Thr	GCC Ala	CTC Leu	CAG Gln	1195
GAG Glu 355	GCC Ala	CTG Leu	AAG Lys	GAG Glu	AAG Lys 360	CAG Gln	CAG Gln	CAC His	ATT Ile	GAG Glu 365	CAG Gln	CTG Leu	CTG Leu	1237
GCG Ala	GAA Glu 370	CGG Arg	GAT Asp	CTG Leu	GAG Glu	AGG Arg 375	GCG Ala	GAG Glu	GTG Val	GCC Ala 380	AAG Lys	GCC Ala	ACG Thr	1279
AGC Ser	CAC His 385	GTG Val	GGG Gly	GAG Glu	ATA Ile	GAG Glu	CAG Gln 390	GAG Glu	CTA Leu	GCT Ala	CTG Leu	GCC Ala 395	CGG Arg	1321
GAC Asp	GGA Gly	CAT His	GAC Asp 400	CAG Gln	CAT His	GTC Val	CTG Leu	GAA Glu 405	TTG Leu	GAA Glu	GCC Ala	AAA Lys	ATG Met 410	1363
GAC Asp	CAG Gln	CTG Leu	CGA Arg	ACA Thr 415	ATG Met	GTG Val	GAA Glu	GCT Ala	GCT Ala 420	GAC Asp	AGG Arg	GAG Glu	AAG Lys	1405
GTG Val 425	GAG Glu	CTT Leu	CTC Leu	AAC Asn	CAG Gln 430	CTT Leu	GAA Glu	GAG Glu	GAG Glu	AAA Lys 435	AGG Arg	AAG Lys	GTT Val	1447

SEQ ID NO:1, Fortsetzung

GAG Glu	GAC Asp 440	CTT Leu	CAG Gln	TTC Phe	CGG Arg	GTT Val 445	GAA Glu	GAA Glu	GAA Glu	TCA Ser	ATT Ile 450	ACC Thr	AAA Lys	1489
GGT Gly	GAT Asp	CTT Leu 455	GAG Glu	ACG Thr	CAG Gln	ACC Thr	AAA Lys 460	CTG Leu	GAG Glu	CAT His	GCC Ala	CGC Arg 465	ATT Ile	1531
AAG Lys	GAG Glu	CTT Leu	GAA Glu 470	CAG Gln	AGC Ser	CTG Leu	CTC Leu	TTT Phe 475	GAA Glu	AAG Lys	ACC Thr	AAA Lys	GCT Ala 480	1573
GAC Asp	AAA Lys	CTC Leu	CAG Gln	AGG Arg 485	GAG Glu	TTA Leu	GAA Glu	GAC Asp	ACT Thr 490	AGG Arg	GTG Val	GCT Ala	ACA Thr	1615
GTT Val 495	TCA Ser	GAA Glu	AAG Lys	TCA Ser	CGT Arg 500	ATA Ile	ATG Met	GAA Glu	CTG Leu	GAG Glu 505	AAA Lys	GAC Asp	CTA Leu	1657
GCA Ala	TTG Leu 510	AGA Arg	GTA Val	CAG Gln	GAA Glu	GTA Val 515	GCT Ala	GAG Glu	CTC Leu	CGA Arg	AGA Arg 520	AGG Arg	CTA Leu	1699
GAG Glu	TCC Ser	AAT Asn 525	AAG Lys	CCT Pro	GCT Ala	GGG Gly	GAT Asp 530	GTG Val	GAC Asp	ATG Met	TCA Ser	CTT Leu 535	TCC Ser	1741
CTT Leu	TTG Leu	CAA Gln	GAG Glu 540	ATA Ile	AGC Ser	TCT Ser	TTG Leu	CAA Gln 545	GAA Glu	AAG Lys	TTA Leu	GAA Glu	GTC Val 550	1783
ACC Thr	CGT Arg	ACT Thr	GAC Asp	CAC His 555	CAG Gln	AGA Arg	GAA Glu	ATA Ile	ACT Thr 560	TCT Ser	CTG Leu	AAG Lys	GAG Glu	1825
CAT His 565	TTT Phe	GGA Gly	GCC Ala	CGG Arg	GAA Glu 570	GAA Glu	ACT Thr	CAT His	CAG Gln	AAG Lys 575	GAG Glu	ATA Ile	AAG Lys	1867
GCT Ala	CTG Leu 580	TAT Tyr	ACC Thr	GCC Ala	ACG Thr	GAA Glu 585	AAG Lys	CTT Leu	TCC Ser	AAA Lys	GAG Glu 590	AAC Asn	GAG Glu	1909
TCA Ser	TTG Leu	AAA Lys 595	AGC Ser	AAG Lys	CTG Leu	GAG Glu	CAT His 600	GCC Ala	AAC Asn	AAA Lys	GAG Glu	AAC Asn 605	TCA Ser	1951
GAT Asp	GTG Val	ATA Ile	GCT Ala 610	CTA Leu	TGG Trp	AAG Lys	TCC Ser	AAA Lys 615	CTG Leu	GAG Glu	ACT Thr	GCC Ala	ATC Ile 620	1993
GCA Ala	TCC Ser	CAC His	CAG Gln	CAG Gln 625	GCG Ala	ATG Met	GAA Glu	GAA Glu	CTG Leu 630	AAG Lys	GTA Val	TCT Ser	TTC Phe	2035
AGC Ser 635	AAA Lys	GGG Gly	CTT Leu	GGA Gly	ACA Thr 640	GAG Glu	ACG Thr	GCA Ala	GAA Glu	TTT Phe 645	GCT Ala	GAA Glu	CTA Leu	2077
AAA Lys	ACA Thr 650	CAA Gln	ATA Ile	GAG Glu	AAA Lys	ATG Met 655	AGA Arg	CTA Leu	GAT Asp	TAC Tyr	CAA Gln 660	CAC His	GAA Glu	2119
ATA Ile	GAA Glu	AAT Asn 665	TTG Leu	CAG Gln	AAT Asn	CAA Gln 670	CAA Gln	GAC Asp	TCT Ser	GAA Glu	CGG Arg	GCT Ala 675	GCC Ala	2161
CAT His	GCT Ala	AAA Lys	GAG Glu 680	ATG Met	GAA Glu	GCC Ala	TTG Leu	AGG Arg 685	GCT Ala	AAA Lys	CTG Leu	ATG Met	AAA Lys 690	2203
GTT Val	ATT Ile	AAA Lys	GAA Glu	AAG Lys 695	GAA Glu	AAC Asn	AGT Ser	CTG Leu	GAA Glu 700	GCC Arg	ATC Ser	AGG Lys	TCG Leu	2245

SEQ ID NO:1, Fortsetzung

AAA Ala 705	CTG Ile	GAC Asp	AAA Lys	GCA Ala	GAA Glu 710	GAC Asp	CAG Gln	CAT His	CTC Leu	GTA Val 715	GAA Glu	ATG Met	GAA Glu	2287
GAC Asp	ACG Thr 720	TTA Leu	AAC Asn	AAA Lys	TTA Leu	CAG Gln 725	GAA Glu	GCT Ala	GAA Glu	ATA Ile	AAG Lys 730	GTA Val	AAG Lys	2329
GAG Glu	CTA Leu	GAG Glu 735	GTA Val	CTG Leu	CAA Gln	GCC Ala	AAA Lys 740	TGC Cys	AAT Asn	GAA Glu	CAA Gln	ACC Thr 745	AAG Lys	2371
GTT Val	ATT Ile	GAT Asp	AAT Asn 750	TTT Phe	ACA Thr	TCA Ser	CAG Gln	CTC Leu 755	AAG Lys	GCT Ala	ACT Thr	GAA Glu	GAA Glu 760	2413
AAG Lys	CTC Leu	TTG Leu	GAT Asp	CTT Leu 765	GAT Asp	GCA Ala	CTT Leu	CGG Arg	AAA Lys 770	GCC Ala	AGT Ser	TCC Ser	GAA Glu	2455
GGT Gly 775	AAA Lys	TCG Ser	GAA Glu	ATG Met	AAG Lys 780	AAA Lys	CTT Leu	AGA Arg	CAG Gln	CAG Gln 785	CTT Leu	GAG Glu	GCA Ala	2497
GCT Ala	GAG Glu 790	AAA Lys	CAG Gln	ATT Ile	AAA Lys	CAT His 795	TTA Leu	GAG Glu	ATT Ile	GAA Glu	AAG Lys 800	AAT Asn	GCT Ala	2539
GAA Glu	AGT Ser	AGC Ser 805	AAG Lys	GCT Ala	AGT Ser	AGC Ser	ATT Ile 810	ACC Thr	AGA Arg	GAG Glu	CTC Leu	CAG Gln 815	GGG Gly	2581
AGA Arg	GAG Glu	CTA Leu	AAG Lys 820	CTT Leu	ACT Thr	AAC Asn	CTT Leu	CAG Gln 825	GAA Glu	AAT Asn	TTG Leu	AGT Ser	GAA Glu 830	2623
GTC Val	AGT Ser	CAA Gln	GTG Val	AAA Lys 835	GAG Glu	ACT Thr	TTG Leu	GAA Glu	AAA Lys 840	GAA Glu	CTT Leu	CAG Gln	ATT Ile	2665
TTG Leu 845	AAA Lys	GAA Glu	AAG Lys	TTT Phe	GCT Ala 850	GAA Glu	GCT Ala	TCA Ser	GAG Glu	GAG Glu 855	GCA Ala	GTC Val	TCT Ser	2707
GTT Val	CAG Gln 860	AGA Arg	AGT Ser	ATG Met	CAA Gln	GAA Glu 865	ACT Thr	GTA Val	AAT Asn	AAG Lys	TTA Leu 870	CAC His	CAA Gln	2749
AAG Lys	GAG Glu	GAA Glu 875	CAG Gln	TTT Phe	AAC Asn	ATG Met	CTG Leu 880	TCT Ser	TCT Ser	GAC Asp	TTG Leu	GAG Glu 885	AAG Lys	2791
CTG Leu	AGA Arg	GAA Glu	AAC Asn 890	TTA Leu	GCA Ala	GAT Asp	ATG Met	GAG Glu 895	GCA Ala	AAA Lys	TTT Phe	AGA Arg	GAG Glu 900	2833
AAA Lys	GAT Asp	GAG Glu	AGA Arg	GAA Glu 905	GAG Glu	CAG Gln	CTG Leu	ATA Ile	AAG Lys 910	GCA Ala	AAG Lys	GAA Glu	AAA Lys	2875
CTG Leu 915	GAA Glu	AAT Asn	GAC Asp	ATT Ile	GCA Ala 920	GAA Glu	ATA Ile	ATG Met	AAG Lys	ATG Met 925	TCA Ser	GGA Gly	GAT Asp	2917
AAC Asn	TCT Ser 930	TCT Ser	CAG Gln	CTG Leu	ACA Thr	AAA Lys 935	ATG Met	AAC Asn	GAT Asp	GAA Glu	TTA Leu 940	CGT Arg	CTG Leu	2959
AAA Lys	GAA Glu	AGA Arg 945	GAT Asp	GTA Val	GAA Glu	GAA Glu	TTA Leu 950	CAG Gln	CTA Leu	AAA Lys	CTT Leu	ACA Thr 955	AAG Lys	3001
GCT Ala	AAT Asn	GAA Glu	AAT Asn 960	GCA Ala	AGT Ser	TTT Phe	CTG Leu	CAA Gln 965	AAA Lys	AGT Ser	ATT Ile	GAG Glu	GAC Asp 970	3043

SEQ ID NO: 1, Fortsetzung

ATG Met	ACT Thr	GTC Val	AAA Lys	GCT Ala 975	GAA Glu	CAG Gln	AGC Ser	CAG Gln	CAA Gln 980	GAA Glu	GCA Ala	GCT Ala	AAA Lys	3085
AAG Lys 985	CAT His	GAG Glu	GAA Glu	GAA Glu	AAG Lys 990	AAA Lys	GAA Glu	TTG Leu	GAG Glu	AGG Arg 995	AAA Lys	TTG Leu	TCG Ser	3127
GAC Asp	CTG Leu 1000	GAA Glu	AAG Lys	AAA Lys	ATG Met	GAA Glu 1005	ACA Thr	AGC Ser	CAC His	AAC Asn	CAG Gln 1010	TGT Cys	CAG Gln	3169
GAG Glu	CTG Leu	AAA Lys 1015	GCC Ala	AGG Arg	TAT Tyr	GAG Glu	AGA Arg 1020	GCC Ala	ACI Thr	TCT Ser	GAG Glu	ACA Thr 1025	AAA Lys	3211
ACC Thr	AAG Lys	CAT His	GAA Glu 1030	GAA Glu	ATC Ile	CTA Leu	CAG Gln	AAC Asn 1035	CTC Leu	CAG Gln	AAG Lys	ACG Thr	CTG Leu 1040	3253
CTG Leu	GAC Asp	ACA Thr	GAG Glu	GAC Asp 1045	AAG Lys	CTG Leu	AAG Lys	GGC Gly	GCA Ala 1050	CGG Arg	GAG Glu	GAG Glu	AAC Asn	3295
AGT Ser 1055	GGC Gly	TTG Leu	CTG Leu	CAG Gln	GAG Glu 1060	CTG Leu	GAG Glu	GAG Glu	CTG Leu	AGA Arg 1065	AAG Lys	CAA Gln	GCC Ala	3337
GAC Asp	AAA Lys 1070	GCC Ala	AAA Lys	GCT Ala	GCT Ala	CAA Gln 1075	ACA Thr	GCG Ala	GAA Glu	GAT Asp	GCC Ala 1080	ATG Met	CAG Gln	3379
ATA Ile	ATG Met	GAA Glu 1085	CAG Gln	ATG Met	ACC Thr	AAA Lys	GAG Glu 1090	AAG Lys	ACT Thr	GAG Glu	ACT Thr	CTG Leu 1095	GCC Ala	3421
TCC Ser	TTG Leu	GAG Glu	GAC Asp 1100	ACC Thr	AAG Lys	CAA Gln	ACA Thr	AAT Asn 1105	GCA Ala	AAA Lys	CTA Leu	CAG Gln	AAT Asn 1110	3463
GAA Glu	TTG Leu	GAC Asp	ACA Thr	CTT Leu 1115	AAA Lys	GAA Glu	AAC Asn	AAC Asn	TTG Leu 1120	AAA Lys	AAT Asn	GTG Val	GAA Glu	3505
GAG Glu 1125	CTG Leu	AAC Asn	AAA Lys	TCA Ser	AAA Lys 1130	GAA Glu	CTC Leu	CTG Leu	ACT Thr	GTA Val 1135	GAG Glu	AAT Asn	CAA Gln	3547
AAA Lys	ATG Met 1140	GAA Glu	GAA Glu	TTT Phe	AGG Arg	AAA Lys 1145	GAA Glu	ATA Ile	GAA Glu	ACC Thr	CTA Leu 1150	AAG Lys	CAG Gln	3589
GCA Ala	GCA Ala	GCT Ala 1155	CAG Gln	AAG Lys	TCC Ser	CAG Gln	CAG Gln 1160	CTT Leu	TCA Ser	GCG Ala	TTG Leu 1165	CAA Gln	GAA Glu	3631
GAG Glu	AAC Asn	GTT Val	AAA Lys 1170	CTT Leu	GCT Ala	GAG Glu	GAG Glu	CTG Leu 1175	GGG Gly	AGA Arg	AGC Ser	AGG Arg	GAC Asp 1180	3673
GAA Glu	GTC Val	ACA Thr	AGT Ser	CAI His 1185	CAA Gln	AAG Lys	CTG Leu	GAA Glu	GAA Glu 1190	GAA Glu	AAG Arg	TCT Ser	GTG Val	3715
CTC Leu 1195	AAT Asn	AAT Asn	CAG Gln	TTG Leu	TTA Leu 1200	GAA Glu	ATG Met	AAA Lys	AAA Lys	AGA Arg 1205	GAA Glu	TCC Ser	AAG Lys	3757
TTC Phe	ATA Ile 1210	AAA Lys	GAC Asp	GCA Ala	GAT Asp	GAA Glu 1215	GAG Glu	AAA Lys	GCT Ala	TCC Ser	TTG Leu 1220	CAG Gln	AAA Lys	3799
TCC Ser	ATC Ile	AGT Ser 1225	ATA Ile	ACT Thr	AGT Ser	GCC Ala	TTA Leu 1230	CTC Leu	ACA Thr	GAA Glu	AAG Lys	GAT Asp 1235	GCC Ala	3841

SEQ ID NO: 1, Fortsetzung

GAG Glu	CTG Leu	GAG Glu	AAA Lys 1240	CTG Leu	AGA Arg	AAT Asn	GAG Glu	GTC Val 1245	ACA Thr	GTG Val	CTC Leu	AGG Arg	GGA Gly 1250	3883
GAA Glu	AAC Asn	GCC Ala	TCT Ser	GCC Ala 1255	AAG Lys	TCC Ser	TTG Leu	CAT His	TCA Ser 1260	GTT Val	GTT Val	CAG Gln	ACT Thr	3925
CTA Leu 1265	GAG Glu	TCT Ser	GAT Asp	AAG Lys	GTG Val 1270	AAG Lys	CTC Leu	GAG Glu	CTC Leu	AAG Lys 1275	GTA Val	AAG Lys	AAC Asn	3967
TTG Leu	GAG Glu 1280	CTT Leu	CAA Gln	CTC Leu	AAA Lys	GAA Glu 1285	AAC Asn	AAG Lys	AGG Arg	CAG Gln	CTC Leu 1290	AGC Ser	AGC Ser	4009
TCC Ser	TCA Ser	GGT Gly 1295	AAT Asn	ACA Thr	GAC Asp	ACT Thr	CAG Gln 1300	GCA Ala	GAC Asp	GAG Glu	GAT Asp	GAA Glu 1305	AGA Arg	4051
GCC Ala	CAG Gln	GAG Glu	AGT Ser 1310	CAG Gln	ATT Ile	GAT Asp	TTC Phe	CTA Leu 1315	AAT Asn	TCA Ser	GTA Val	ATA Ile	GTG Val 1320	4093
GAC Asp	CTT Leu	CAA Gln	AGG Arg	AAG Lys 1325	AAT Asn	CAA Gln	GAC Asp	CTC Leu	AAG Lys 1330	ATG Met	AAG Lys	GTG Val	GAG Glu	4135
ATG Met 1335	ATG Met	TCA Ser	GAA Glu	GCA Ala	GCC Ala 1340	CTG Leu	AAT Asn	GGG Gly	AAC Asn	GGG Gly 1345	GAT Asp	GAC Asp	CTA Leu	4177
AAC Asn	AAT Asn 1350	TAT Tyr	GAC Asp	AGT Ser	GAT Asp	GAT Asp 1355	CAG Gln	GAG Glu	AAA Lys	CAG Gln	TCC Ser 1360	AAG Lys	AAG Lys	4219
AAA Lys	CCT Pro	CGC Arg 1365	CTC Leu	TTC Phe	TGT Cys	GAC Asp	ATT Ile 1370	TGT Cys	GAC Asp	TGC Cys	TTT Phe	GAT Asp 1375	CTC Leu	4261
CAC His	GAC Asp	ACA Thr	GAG Glu 1380	GAT Asp	TGT Cys	CCT Pro	ACC Thr	CAG Gln 1385	GCA Ala	CAG Gln	ATG Met	TCA Ser	GAG Glu 1390	4303
GAC Asp	CCT Pro	CCC Pro	CAT His	TCC Ser 1395	ACA Thr	CAC His	CAT His	GGC Gly	AGT Ser 1400	CGG Arg	GGT Gly	GAG Glu	GAA Glu	4345
CGC Arg 1405	CCA Pro	TAC Tyr	TGT Cys	GAA Glu	ATC Ile 1410	TGT Cys	GAG Glu	ATG Met	TTT Phe	GGA Gly 1415	CAC His	TGG Trp	GCC Ala	4387
ACC Thr	AAC Asn 1420	TGC Cys	AAT Asn	GAC Asp	GAC Asp	GAA Glu 1425	ACC Thr	TTC Phe	TGATGAAGCC					4424
TCCAGTGGAG			AACTGGGCTT			GCTCAGACGC			ACTCGCATIG			ACACAACGTA		4474
ACACCAGCAT			TGTGTGTGCA			GACTTCAGGA			GAACTCATGT			TATTTTTTAA		4524
CCCCGTCAAC			AAATCTAGGA			AAATATTTTG			ATCTTCAACA			AATTGCCCTT		4574
TAGTCTCCCC			GTATGAGTTA			GAATAATAAA			TATTTAGTAG			GTGAGTTTTC		4624
ACCTCGAATT			TTGTTTTCTT			GATTTTACG			TTTGAAGACA			TTGCACCAGA		4674
TGCCATTACA			TTTATTGGCC			CCCCGACCTT			GTAGAAAAAC			CCCTACCCTC		4724
ACAATACCTT			ATTAAAGTAA			C1TTAAATTA			TGCCGTTACT			TTTCATATTT		4774
GCACCTAAGA			TATTTCCAGG			CTGCATTTGT			ATATTTAGAT			TTTTTGTTA		4824
AGCTTTGACA			CTGGAATGAG			TTGAAAAAAT			GTGCCATTTT			GCATTTTCAT		4874
CTACTCATTT			AAAGTATTTT			ATTCTTATTC			AAAGAAATAT			CTGAGCTCTT		4924
TGCACTACCT			GTTATCAGTA			GTGCCTTTAC			TTCAGGCTTG			ATAATACTTA		4974
GGTGTGATTA			TAAAATCATG			AAGCAGGTAA			AGGGAGGGGC			AAGCCCCAAA		5024

SEQ ID NO: 1, Fortsetzung

CTGCTGTGGG	GACATTTTAT	AATCTATATG	CTGCACCCAC	TTAATCTACT	5074
GTGGTGTTTT	GTTTATTAGT	TTTGCATAAT	TTCAGCTTCT	ATATATTGTA	5124
TGTATATATT	TTTTAAAAAT	CTATATTTTG	GGAAAAAAAC	ATACACAATG	5174
TGTCITTCIT	TTTGGACATT	TACCTTTTTG	AAAAAGAAAA	CACTTAAAAT	5224
GATCATTAGG	ACATAACAGA	CTAGGCCAGA	CATAGCATCT	TGTGGCTTTG	5274
CAACCATTTT	CATTTGTTTG	TTTTCTTTT	ATTCTTCAC	CAGATTTAAA	5324
TAAAAGGAGG	AATTTTCTCC	AATTTTTTTT	TCCTTCTCTG	GCAGGTATCC	5374
CCAGCAGTCA	ATTAACAATA	AGCCAGTATA	AAACACCTAA	ATAACCAATC	5424
TACAATCTCC	CTTCACAAGT	TTTTTTACTG	TTTTTAGATG	AATGTACGAT	5474
GAGAAATTCA	ACGTTAATAA	TTCTGGATTT	TCTTATCACA	AAAAAGAAAA	5524
TGAAGGACCT	CAAAGCACCT	GAACAGTTTA	TCGACCAGTT	TGAATCTATT	5574
TATCTTCATT	TGAATGTCTT	CTAGATATGT	AAAAAGTCAT	AAAATGTATC	5624
TTCCATGCTA	CATGTACAAT	AAGAACTTCT	ATAATTGTAT	ATATGCCTTT	5674
GATGTATTTT	CCCCTCAAGA	TTATCAACTG	TGTGTTGAC	AGTGAATATT	5724
CAATCTGGTA	CCAGTTGAAA	TTTTTGTTA	TAAATGTAAT	ACGAATTGTT	5774
TCACAAACAG	AAAACAAGTA	AAGCAGTATT	AAAATTTGGC	CAAACAAGTG	5824
TTCTGTATCT	ACTTTTAATA	AATGGTTATT	CTTT		5858